

# ANÀLISI DE PATRONS FUNCIONALS I ESTRUCTURALS EN LA REGULACIÓ DEL CALCI EN LES CÈL·LULES CARDÍAQUES

**Carme Nolla Colomer**

Director      Raúl Benítez Iglesias

Co-Director      Leif Hove Madsen

PROGRAMA DE DOCTORAT  
D'ENGINYERIA BIOMÈDICA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA  
DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

# **ANÀLISI DE PATRONS FUNCIONALS I ESTRUCTURALS EN LA REGULACIÓ DEL CALCI EN LES CÈL·LULES CARDÍAQUES**

Carme Nolla Colomer

Barcelona, 2021

**DIRECTORS:**

Raúl Benítez Iglesias i Leif Hove Madsen

Aquest treball s'ha realitzat sota la direcció del professor Dr. Raúl Benítez Iglesias, del Departament d'Enginyeria de Sistemes, Automàtica i Informàtica Industrial, ESAII, de la Universitat Politècnica de Catalunya i codirigit pel Dr. Leif Hove Madsen, científic titular de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, IIBB-CSIC.



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA  
DE CATALUNYA  
BARCELONATECH**

**PROGRAMA DE DOCTORAT D'ENGINYERIA BIOMÈDICA**

**Departament d'Enginyeria de Sistemes, Automàtica i Informàtica Industrial**

**Centre de Recerca d'Enginyeria Biomèdica**

# AGRAÏMENTS

Primer de tot m'agradaria agrair als meus tutors, Raúl i Leif, per donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi sota la seva tutela, sense ells aquest projecte no hagués estat possible. Gràcies per aportar-me nous coneixements i permetre'm gaudir d'aquesta experiència. Realitzar la tesi no ha consistit només en focalitzar-me en els meus objectius i coneixements, sinó també compartir espai amb persones meravelloses i m'ha permès assistir a congressos internacionals per absorbir nous coneixements i experiències.

També m'agradaria agrair als companys i companyes del laboratori de Sant Pau, Vero, Adela, Carmen, Hildegard, Anna, Sergi i Paloma, els quals m'han ensenyat el que és treballar en projectes amb objectius comuns i com afecta la part social en la motivació per tal de que els treballs segueixin endavant, que és un dels valors que ens ha transmès el nostre tutor i que m'agradaria preservar per futurs projectes.

Per altra banda, agrair als companys i companyes del LASSIE LAB, Alex, Basak, Ferran, Adrià i Xavier, i del CREB, Maria, Enrico, Joshua, Ángela, Ana, Sergi, Jon, Pols, Anna i Natàlia, per posar l'altra cara de la moneda, treballar conjuntament però en projectes diferents. Gràcies a ells he pogut obtenir punts de vista completament diferents però igual d'enriquidors, no tan sols dels projectes, sinó també en els diferents temes de discussió que han anat sorgint en les hores de convivència. També agrair a la direcció del CREB, en especial al professor Alexandre Perera, per oferir-nos aquest espai i permetre'ns formar-nos tots els doctorands conjuntament.

Agrair als meus companys de pis, en especial a la Maria i en Ferran, i als amics per seguir al meu costat durant aquest camí i aportar-me tant consells com moments de dispersió durant el desenvolupament de la tesi. Crec que és important valorar les persones que t'envolten i penso que també constitueixen una part important en el procés.

Per últim, volia donar les gràcies a la meva família, a la meva mare, al meu pare, a la meva germana Mariona i a la meva àvia, per tot el seu suport i per ajudar-me sempre que ho he necessitat. Sense ells aquesta tesi tampoc hagués estat possible.

## CATALÀ

Segons les dades publicades per l'Organització Mundial de la Salut el 2019, la isquèmia cardíaca és la causa de mortalitat que ocupa el primer lloc a nivell mundial [1]. Aquesta patologia és deguda a irregularitats en el funcionament del mecanisme contràctil, començant a nivell cel·lular, fins arribar a nivell d'òrgan. Per arribar a l'arrel d'aquestes disfuncions, en aquesta tesi es realitzarà un estudi a nivell cel·lular i molecular. Els petits canvis en aquest nivell poden arribar a escalar cap a una electrofisiologia cardíaca anòmala.

Durant els darrers anys, els estudis de fisiologia cardíaca han relacionat les arrítmies amb l'augment de l'activitat espontània de calci global a nivell cel·lular [2][3]–[5], [6], [30], [34]–[36], [8], [12]–[15]. Els principals encarregats de regular el calci en les cèl·lules dels miòcits cardíacs són els receptors de rianodina, que alliberen el calci emmagatzemat al reticle sarcoplasmàtic al citosol. Aquest s'uneix a l'actina i la miosina de la cèl·lula produint la contracció mecànica. Les irregularitats en l'activitat de calci han estat relacionades amb la fosforilació d'aquests canals, ja que un cop fosforilats la probabilitat d'obertura dels receptors augmenta.

Als laboratoris de biologia i fisiologia es treballa amb volums relativament grans dades experimentals, que posteriorment s'han de caracteritzar, agrupar i donar un sentit als canvis observats. En vista d'aquest fet, s'ha volgut realitzar una tesi interdisciplinària, adquirint dades amb el microscopi confocal al laboratori i creant noves eines de processament d'imatges per facilitar una anàlisi interpretable de les dades experimentals.

L'objectiu principal del projecte és caracteritzar l'activitat espontània del calci mitjançant tècniques de processament d'imatge i observar les variacions d'aquesta amb diferents condicions fisiològiques, com ara la fosforilació dels receptors de rianodina o amb cèl·lules de pacients amb arrítmia. Veure com les modificacions en l'activitat de calci afecten a la propagació d'aquest al llarg de la cèl·lula i caracteritzar la perillositat de les variacions a l'hora d'induir un mal funcionament elèctric i contràctil i, per tant, donar a lloc arrítmies.

En motiu d'assolir aquest objectius la tesis es divideix en tres grans apartats o hipòtesis:

1. Obtenció de dades experimentals, definició del millor mètode per realitzar els estudis de les imatges de calci i proposta d'un mètode de detecció i quantificació d'estructures cel·lulars i esdeveniments de calci.
2. Estudi de la subestructura dels esdeveniments de calci i els clústers de receptors de rianodina involucrats. Comparació de les propietats de l'activitat de calci de les cèl·lules a nivell basal i sota condicions d'arrítmia o fosforilació.

3. Estudi dels canvis electrofisiològics en l'activitat del calci emprant diferents vies de fosforilació dels canals de receptors de rianodina.

Els resultats obtinguts expliquen la distribució dels receptors de rianodina en les cèl·lules, permeten tenir una visió de les activacions d'aquests canals durant l'activitat espontània de calci i mostren detalls rellevants, com ara l'augment de la durada, l'augment en el volum de calci alliberat i l'augment del nombre de clústers receptors de rianodina activats. Aquestes modificacions provoquen esdeveniments més grans i, per tant, més potencialment perillosos, ja que poden arribar a despolaritzar cèl·lules veïnes. Aquests paràmetres reflecteixen la relació entre la fosforilació dels receptors de rianodina i l'alliberament espontani de calci durant el procés d'aritmogènesi.

# ABSTRACT

## ENGLISH

In 2019 the data published by the World Health Organization showed that the cardiac ischemia is the first cause of death worldwide [1]. These diseases are caused by irregularities of the contractile mechanism's function, starting from the cellular level till the organ dysfunction. To further understand the origin of these dysfunctions the thesis will focus on the molecular and cellular level. The small changes of the physiology at that level can lead to an anomalous cardiac electrophysiology.

The previous studies suggest that there is a relation between the cardiac arrhythmia and the increase of global spontaneous calcium activity in cells [2][3]-[5], [6], [30], [34]-[36], [8], [12]-[15]. Ryanodine receptors have the major role in the calcium regulation. They release the calcium stored in the sarcoplasmic reticulum into the cytosol, then the calcium attaches to the actin and myosin to produce the mechanical contraction of the cell. The irregularities have been also related with an hyperphosphorylation of the ryanodine receptor channels, which increases the open probability of those.

A large amount of data is generated in the biology and physiology laboratories, these have to be characterized, clustered and analysed to extract the meaning of the observed divergences. Thus, an interdisciplinary thesis has been developed in order to obtain experimental data with a confocal microscope in the laboratory and then creating new image processing tools in order to have an interpretable analysis of the experimental data.

The main objective of the project is to characterize the spontaneous calcium activity through image processing tools and to observe its variations under different physiological conditions, such as the hiperphosphorylation of the ryanodine receptor channels or under cardiac arrhythmia conditions. The aim is to see how the modifications in the calcium activity affect to the propagation along the cell and report how the variations may lead to electric and contractile dysfunctions, and so, cause arrhythmias.

To reach this goals the thesis is divided into three main sections or hypothesis:

1. Experimental data acquisition, define the best image acquisition method in order to develop the studies of calcium images and proposal of methods to detect subcellular structures and spontaneous calcium events.
2. Study of the calcium events substructure and the involved ryanodine receptor clusters. Comparison of the calcium activity properties of the cells at the basal level and under conditions of hyperphosphorylation or arrhythmia.

3. Study of the physiological modifications in the calcium activity through different phosphorylation pathways.

The results explain the ryanodine receptor clusters distribution through the cells, allow to have the localization of the channels and the calcium activity simultaneously and show relevant details such as, the increase in the duration of the events or the increase in the volume of calcium released when more ryanodine receptor clusters are coactivated. These modifications lead to have bigger events and, thus, more potentially dangerous because can depolarize the neighbouring cells. The parameters reflect the relationship between the phosphorylation of the ryanodine receptors and the spontaneous calcium release in the arrhythmogenesis process.

# ESTRUCTURA DE LA TESIS

**PART I** INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA (CAPÍTOLS 1 I 2)

**PART II** RESULTATS (CAPÍTOLS 3, 4, I 5)

**PART III** CONCLUSIONS



# ÍNDEX

Agraïments.....	2
Resum .....	3
Abstract.....	5
Acrònims.....	12
CAPÍTOL 1 INTRODUCCIÓ .....	16
1.1    Introducció.....	17
1.2    Motivació.....	18
1.3    Biomarcadors i noves tècniques d'anàlisi.....	19
1.4    Fonaments biològics .....	20
1.4.1    La contracció del cor i els cardiomiòcits .....	20
1.4.2    Receptors de rianodina .....	23
1.4.3    Activitat de calci .....	24
1.4.4    Fosforilació de les serines dels receptors de rianodina .....	25
1.5    Models de cardiologia .....	27
1.6    Obtenció experimental de les imatges.....	27
1.6.1    Preparació de les mostres.....	28
1.6.2    Microscopia de fluorescència .....	30
1.7    Mètodes de processament de les imatges .....	33
1.7.1    Normalització i estat basal.....	33
1.7.2    Estimació del soroll i filtratge .....	35
1.7.3    Mètodes de segmentació .....	39
1.7.4    Mètodes d'agrupament.....	42
1.7.5    Programari.....	43
1.8    Estat de l'art.....	44
1.8.1    Detecció i caracterització d'estructures.....	44
1.8.2    Detecció i caracterització d'esdeveniments .....	46
1.9    Objectius.....	48
CAPÍTOL 2 METODOLOGIA .....	49

2.1	Obtenció d'imatges .....	50
2.1.1	Preparació de les cèl·lules.....	50
2.1.2	Fluoròfors.....	52
2.1.3	Resolucions i límit de difracció.....	53
2.1.4	Artefactes del microscopi i variabilitat experimental .....	55
2.1.5	Exportació de les imatges.....	57
2.2	Detecció i caracterització dels RyRs .....	58
2.2.1	Detecció.....	58
2.2.2	Caracterització dels RyRs.....	59
2.2.3	Detecció en fotogrames temporals .....	62
2.2.4	Validació detecció dels canals .....	63
2.3	Detecció i caracterització d'esdeveniments de Calci .....	65
2.3.1	Obtenció dels senyals.....	66
2.3.2	Normalització dels senyals .....	67
2.3.3	Mètode detecció d'esdeveniments .....	68
2.3.4	Quantificació dels paràmetres .....	69
2.3.5	Filtratge dels esdeveniments.....	71
2.3.6	Agrupació de les activacions en sparks.....	72
2.3.7	Quantificació dels paràmetres de sparks .....	73
2.3.8	Quantificació de paràmetres generals d'activitat.....	75
2.3.9	Validació de la detecció .....	79
2.3.10	Anàlisi estadístic.....	81
CAPÍTOL 3 .....		83
Mètodes d'adquisició d'imatges, caracterització espacial dels RyRs i detecció d'esdeveniments de calci .....		83
3.1	Obtenció d'imatges .....	85
3.2	Detecció de d'estructures cel·lulars .....	86
3.2.1	Densitat de RyRs .....	87
3.2.2	Distàncies característiques.....	88
3.2.3	Estimació del soroll.....	90
3.2.4	Validació.....	91

3.3	Mètodes de registre de l'activitat de calci .....	94
3.4	Detecció i caracterització d'esdeveniments .....	97
3.4.1	Caracterització d'esdeveniments de baixa resolució temporal.....	97
3.4.2	Caracterització d'esdeveniments d'alta resolució temporal.....	101
3.4.3	Caracterització d'esdeveniments de molt alta resolució temporal .....	102
3.4.4	Validació detecció esdeveniments .....	106
3.5	Discussió .....	110
CAPÍTOL 4 .....		114
Morfogènesis d'esdeveniments de calci en casos d'arrítmia cardíaca .....		114
4.1	Materials i mètodes .....	116
4.1.1	Preparació dels miòcits i adquisició de les imatges .....	116
4.1.2	Processament de les imatges .....	117
4.2	Resultats .....	118
4.2.1	Massa dels esdeveniments i agrupament dels senyals de calci de RyRs.....	118
4.2.2	Massa dels <i>sparks</i> de calci i distribució de probabilitat en HAM .....	122
4.2.3	L'estimulació $\beta_2$ -adrenergics replica la fibril·lació auricular .....	125
4.3	Discussió .....	131
CAPÍTOL 5 .....		134
Estudi d'esdeveniments de calci sota els efectes dels inhibidors de PDEs i els estimuladors $\beta$ -adrenèrgics .....		134
5.1	Hipòtesi i objectius .....	136
5.2	Materials i mètodes .....	137
5.3	Localització d'estructures de RyR2 i quantificació de la fosforilació .....	138
5.4	Caracterització general de l'activitat del calci .....	140
5.4.1	Morfologia de les activacions de RyR2 clústers .....	140
5.4.2	Propietats morfològiques dels <i>sparks</i> .....	141
5.4.3	Activació i freqüències d'esdeveniments .....	143
5.5	Subestructura de les activacions en els <i>sparks</i> .....	144
5.5.1	<i>Sparks</i> i nombre de clústers de RyR2s actius .....	144
5.6	Coactivacions i morfogènesi d'ones de calci .....	149
5.6.1	Coactivacions de esdeveniments individuals .....	149

5.6.2 Propietats d'esdeveniments globals de les cèl·lules .....	150
5.7 Discussió .....	153
CONCLUSIONS .....	156
Mètodes de processament d'imatges .....	157
Fisiologia cel·lular.....	157
Futures línies d'investigació .....	158
LLISTAT DE PUBLICACIONS .....	160
Publicacions en revistes.....	160
Publicacions enviades a revistes.....	160
Publicacions pendents d'enviar.....	160
Presentacions orals a congressos .....	161
Publicacions a congressos.....	161
REFERÈNCIES.....	163

# ACRÒNIMS

\* ag. – Nom o contracció provinent d'un anglicisme o paraula anglesa.

<b>Acrònim</b>	<b>Nom</b>
RyR2, RyRs, RyR.	Receptors de Riaondina Cardíacs tipus 2
MVM	Miòcits Ventriculars de Ratolí, ag. <i>Mouse Ventricle Myocytes</i>
MAM	Miòcits Auriculars de Ratolí, ag. <i>Mouse Atrial Myocytes</i>
MLAM	Miòcits d'aurícula esquerra de Ratolí, ag. <i>Mouse Left Atrial Myocytes</i>
MRAM	Miòcits d'aurícula dreta de Ratolí, ag. <i>Mouse Right Atrial Myocytes</i>
HAM	Miòcits Auriculars d'Humans, ag. <i>Human Atrial Myocytes</i>
SR	Reticle Sarcoplasmàtic
SER	Reticle Sarcoplasmàtic Estriat
CICR	Alliberament de calci induït per calci
L-type, Cav1.2	Canals de calci tipus L
EC	Excitació - Contracció
PKA	Proteïna kinasa A
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
PLB	Phospholamban
AMP	Adenosine Monophosphate
cAMP	AMP Cíclic
ATP	Adenosine Triphosphate
β-AR	Receptors β-adrenergics
AC	Adenyl Cyclase
PDE	Phosphodiesterase
CRU	Unitat d'alliberament de calci, ag. <i>Calcium Release Unit</i>
NCX	Intercanviador Sodi-Calci
Línies-Z, LZ	Línies Z
Túbuls-T	Túbuls T
Ser-	Serina, nom d'un aminoàcid
FKBP12.6	Proteïna d'unió situada en els homotetràmers dels RyRs
RyRs-P	RyRs en estat fosforilat
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein Kinase II
GFP	Proteïna verda fluorescent, ag. <i>Green Fluorescent Protein</i> ,
ISO	Isoproterenol
FENO	Fenoterol

---

RO	Ro 20-1724
CIL	Cilostamide
CGS	CGS-21680
A <sub>1</sub>	Adenosine A <sub>1</sub> receptor
A <sub>2A</sub>	Adenosine A <sub>2A</sub> receptor
CPA	Cyclopiazonic acid
spark	Nom anglès per definir espurna de calci o activitat de calci localitzada
spk	Abreviatura <i>spark</i>
wave	Nom anglès per onada de calci o propagació desíncrona de calci
STIM	Experiments amb estimulació, ag. <i>Stimulation</i>
$\lambda$	Longitud d'ona
EGTA	Ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
STED	Esgotament d'estats excitats per emissions estimulada, ag. <i>Stimulated Emission Depletion</i>
TIRF	Microscopi de reflexió interna total, ag. <i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>
STORM	Stochastic optical reconstruction microscopy (Reconstrucció òptica estocàstica)
PSF	Point Spread Function (Funció de dispersió de punt)
LS	Line Scan (Escaneig de Línia)
FS	Escaneig de fotograma, ag. <i>Frame Scan</i>
I	Intensitat de la imatge o del píxel
F	Senyal de Fluorescència
F <sub>0</sub>	Estat basal de la fluorescència
ROI	Regió d'interès, ag. <i>Region of interest</i>
FT	Transformada de Fourier, ag. <i>Fourier Transform</i>
FFT	Transformada de Fourier Ràpida, ag. <i>Fast Fourier Transform</i>
WT	Transformada Wavelet, ag. <i>Wavelet Transform</i>
CWT	Transformada de Wavelet continua, ag. <i>Countnuous Wavelet Transform</i>
RGB	Model de color Vermell Verd i Blau, ag. <i>Red, Green and Blue</i>
GMM	Models de mixtures gaussianes, ag. <i>Gaussian Mixture Models</i>
EExM	Microscopia d'expansió millorada, ag. <i>Enhanced Expanson Microscopy</i>
Rhod-2	Fluoròfor indicador de calci
PMT	Tub fotomultiplicador, ag. <i>Photomultiplier Tube</i>
HyD	Detector híbrid, ag. <i>Hybrid Detector</i>
NA	Obertura numèrica, ag. <i>Numerical Aperture</i>
EX/EM	Excitació i Emissió, ag. <i>Excitation Emission</i>
SNR	Ràtio entre el senyal i el soroll, ag. <i>Signal to Noise Ratio</i>
a.u.	Unitats Arbitràries, ag. <i>Arbitrary Unit</i>
AMP, amp	Amplitud
RoR	Ràtio d'elevació, ag. <i>Rate Of Rise</i>
t <sub>2p</sub>	Temps fins al pic, ag. <i>Time to peak</i>
FDHM	Duració completa a mig màxim, ag. <i>Full Duration at Half Maximum</i>

---

---

tau, $\tau$	Constant de decaïment, lletra grega <i>tau</i>
DNN	Distància al veí més proper, ag. <i>Distance Near Neighbor</i>
SZ	Mateixa línia Z, ag. <i>Same Línia Z</i>
DZ	Diferent línia Z, ag. <i>Different Línia Z</i>
CC	Centre de la Cèl·lula
SL	Sarcolemma
ROS	Espècies reactives a l'oxigen, ag. <i>Reactive Oxygen Species</i>

---

**PART I**

**INTRODUCCIÓ I**

**METODOLOGIA**



# **CAPÍTOL 1**

# **INTRODUCCIÓ**

## 1.1 INTRODUCCIÓ

---

Actualment les malalties cardíques segueixen estant en el primer lloc en el llistat de causes de mortalitat del primer món. Moltes d'aquestes irregularitats en la funció del cor són degudes al mal funcionament del mecanisme contràctil, i poden donar-se a nivell cel·lular, del teixit o de l'òrgan. Per tal d'arribar a l'arrel de la qüestió en aquesta tesis es realitzarà un estudi a nivell cel·lular i molecular, ja que aquestes petites alteracions de les concentracions iòniques són les fonts d'error de l'electrofisiologia cardíaca.

En les últimes dècades s'han desenvolupat diversos estudis per caracteritzar la fisiologia cel·lular i molecular a través de imatges de fluorescència. La microscopia confocal permet observar la biologia a escales més petites del que ens permet un microscopi òptic normal, és per aquest motiu que s'utilitzen en els estudis de biologia molecular.

Durant els darrers anys, els estudis de fisiologia cardíaca han relacionat les arrítmies amb l'augment de l'activitat espontània de calci dins la cèl·lula. Aquest augment, a la vegada ha estat relacionat amb la fosforilació dels canals de receptors de rianodina, encarregats de regular l'alliberament de ions de calci del reticle sarcoplasmàtic (SR), que és on s'emmagatzemen aquests ions en els cardiomiòcits.

Als laboratoris de biologia i fisiologia es treballa amb moltes dades experimentals, que s'han de caracteritzar i agrupar, per tal de donar un sentit als canvis observats. Per tant, és necessari crear noves eines per tal de facilitar l'anàlisi d'aquestes dades, com ara programes informàtics d'anàlisi d'imatges. També són importants aquestes tècniques per tal de caracteritzar numèricament les dades més enllà de les capacitats de l'ull humà, mirant minsos canvis d'intensitat o esdeveniments que tenen lloc a altes velocitats. Existeix ja una àmplia col·lecció de mètodes de processament d'imatges i senyals que poden ser de gran utilitat per desenvolupar noves eines útils i viables per caracteritzar les dades experimentals biològiques.

L'objectiu principal del projecte és caracteritzar l'activitat espontània del calci i observar les variacions d'aquesta amb diferents condicions fisiològiques, com ara, sota els efectes de la fosforilació dels receptors de rianodina o en cèl·lules de pacients amb arrítmia. També es vol analitzar com les variacions en l'activitat de calci afecten a la propagació d'aquest al llarg de la cèl·lula, caracteritzar la perillositat de les variacions a l'hora d'induir un mal funcionament elèctric i contràctil i, per tant, donar a lloc arrítmies o altres malalties d'alteració del ritme cardíac.

## 1.2 MOTIVACIÓ

En l'actualitat, el grup de malalties del sistema circulatori es manté com a primera causa de mort en el primer món. Segons l'informe de 2010 de l'Associació Americana del Cor les dades de mortalitat per a 2006 mostren que les malalties cardiovasculars van representar el 34,3% (831.272) de tots els 2.426.264, o el que vindria a ser el mateix, 1 de cada 2.9 morts als Estats Units. A més, gairebé el 33% de les morts degudes a malalties cardiovasculars es va produir abans de l'edat de 75 anys, que és molt abans de l'esperança de vida mitjana (77,7 anys). En el mateix any, 1 de cada 8,6 certificats de defunció (282.754 defuncions) als Estats Units eren a causa de la insuficiència cardíaca [16].

A l'estat Espanyol durant el darrer any (2017) les malalties del sistema circulatori van presentar una taxa de mortalitat de 263,2 per a cada 100.000 habitants, superant a la taxa dels tumors (243,4 per cada 100.000 habitants) i les malalties del sistema respiratori (110,9 per cada 100.000 habitants) [17]. Dintre del grup de malalties circulatories, les malalties isquèmiques del cor, com són l'infart de pit i les cerebrovasculars ocupen el primer i el segon lloc en el nombre de defuncions.



Figura 1. Causes de mortalitat en l'estat espanyol durant el 2017 [2].

Les **malalties de trastorns del ritme cardíac** es situen dintre dels grups d'infart agut de miocardi i insuficiència cardíaca, amb taxes de 35,230 i 40,914 defuncions de cada 1.000 defuncions (Taula 1) i dintre de les malalties cerebrovasculars (Figura 1). Aquest conjunt de malalties es defineix com a una variació de la freqüència del ritme cardíac degut a trastorns en la generació o propagació de l'impuls cardíac a través del sistema de conducció elèctrica del cor o una combinació de ambdós.

Taula 1. Nombre de defuncions per cada 1.000 defuncions en Espanya [2].

Causa de mortalitat	Nombre de defuncions per cada 1.000
Malalties hipertenses	29,586
<b>Infart agut de miocardi</b>	<b>35,230</b>
Altres malalties isquèmiques del cor	42,211
<b>Insuficiència cardíaca</b>	<b>40,914</b>
Altres malalties del cor	57,271

Moltes de les malalties degudes a canvis en freqüència cardíaca, poden ser causades per una acceleració del ritme cardíac (taquicàrdia) o una disminució d'aquest (bradicàrdia), i també poden ser degudes a irregularitats en el ritme cardíac (arrítmies). Aquestes últimes estan generalment ocasionades per anomalies en el marcapassos del cor, també anomenat node sinusal, o per un error en el sistema de conducció elèctrica del cor. Tot i que en alguns casos aquestes malalties es mostren com a asimptomàtiques, comporten efectes adversos, com un augment de trombosis, embòlies, accident cerebrovascular, insuficiència cardíaca i mort sobtada cardíaca.

En aquest marc, es creu que hi ha una necessitat de realitzar un estudi de l'activitat elèctrica cardíaca i de com aquesta interfereix en la contracció del cor, per tal de determinar l'origen dels canvis en la fisiologia cardíaca que comporten les malalties esmentades. L'activitat elèctrica del cor és generada a nivell cel·lular, mitjançant un intercanvi iònic que promou la contracció de tot el múscul cardíac. És per tant necessari, iniciar aquest estudi de alteracions de concentracions iòniques nivell cel·lular de aquestes són l'arrel les malalties del ritme cardíac que afecten a tot l'òrgan.

## 1.3 BIOMARCADORS I NOVES TÈCNIQUES D'ANÀLISIS

---

En la cardiologia mèdica tradicional és freqüent avaluar als pacients amb mètodes d'anàlisi convencionals, mitjançant proves com l'electrocardiograma, angiografia o ultrasons. Aquestes proves reflecteixen l'estat dels òrgans del pacient i proporcionen informació pràctica per a tractar-lo, però malauradament no informen sobre l'origen d'aquestes alteracions.

És per aquest motiu que la tendència general és realitzar medicina més personalitzada i focalitzar en l'arrel de les alteracions. Per això que la ciència avança enfocant-se en les divergències en els cicles cel·lulars i entre les interaccions moleculars, amb l'objectiu d'arribar a designar nous biomarcadors. Per a realitzar aquest tipus de recerca són indispensables les noves tècniques per treballa a escala cel·lular o molecular, per tant és necessari l'ús de microscopis avançats i programari específic per a l'anàlisi de les dades i imatges [18]-[21].

També és important poder desenvolupar tècniques que ajudin a predir les malalties en una etapa més inicial per evitar les greus conseqüències de realitzar el diagnòstic en estats més avançats. La cerca d'extracció de nous biomarcadors, medicina més personalitzada i el descobriment de nous tractaments farmacològics personalitzats són les futures línies d'investigació i el que promourà un gran pas per la medicina.

## 1.4 FONAMENTS BIOLÒGICS

### 1.4.1 La contracció del cor i els cardiomiòcits

La contracció del múscul cardíac s'inicia a partir d'un estímul elèctric en forma de canvi de potencial mediat per l'augment de ions. Aquest fenomen és de vital importància ja que permet al cor bategar de manera controlada, i inconscient per l'organisme. L'ió encarregat de convertir aquesta energia elèctrica del potencial d'acció en energia mecànica, és a dir, la contracció física, és el calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Aquest procés s'inicia amb l'entrada de ions de sodi ( $\text{Na}^+$ ) al citosol de les cèl·lules cardíques, produint una despolarització d'aquestes. Aquesta despolarització promou que s'obrin els canals de calci, incrementant la despolarització amb l'entrada dels ions de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  s'uneix a la proteïna Troponina C, que promou indirectament l'activació de les proteïnes encarregades de la contracció mecànica de la cèl·lula, els miofilaments d'actina i miosina. Aquests estat de contracció es manté fins que la cèl·lula arriba al seu nivell màxim d'ions de  $\text{Ca}^{2+}$ , moment en que els canals de calci es tanquen i s'inicia el procés de repolarització, juntament amb l'obertura dels canals de potassi ( $\text{K}^+$ ). Quan es torna a arribar al nivell basal de la cèl·lula, es repeteix el cicle.

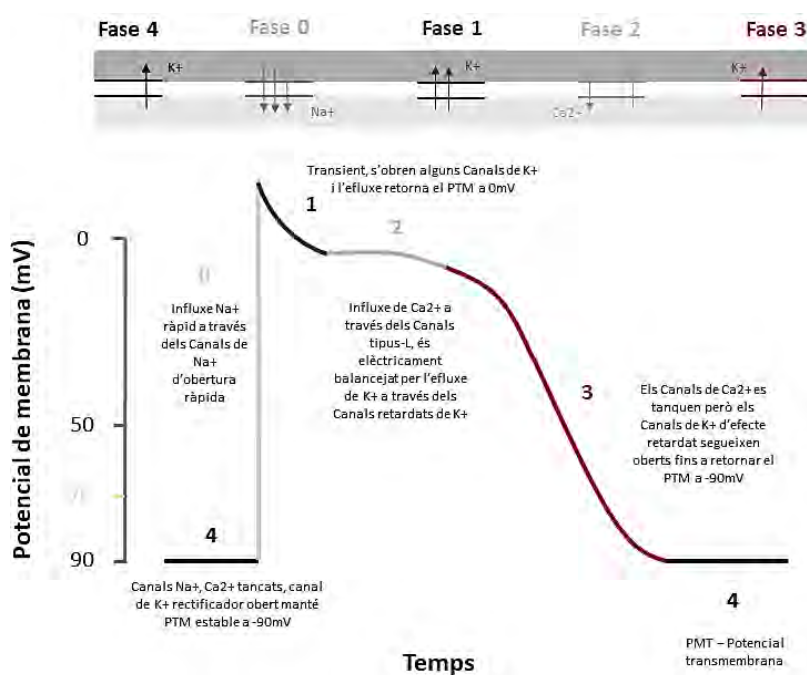


Figura 2. Potencial d'acció i les seves fases.[22]

Les cèl·lules responsables de realitzar la contracció cardíaca són els miòcits cardíacs (o cardiomiòcits), unes cèl·lules excitable situades en el múscul del cor. L'estructura d'aquest múscul cardíac és similar a la del múscul esquelètic: s'organitza en petites fibres que conformen les fàcies musculars. Ambdós casos contenen miofibres organitzades i s'hi pot observar la presència de diversos sarcòmers que fan que mostrin aquesta presència estriada. Tot i així, els cardiomiòcits

presenten diferències significatives respecte els miòcits del múscul esquelètic, tant en estructura com en el funcionament.

Les diferències estructurals inclourien:

- Els cardiomiòcits són més petits, d'una longitud de 100 µm i entre unes 10-25 µm de diàmetre [23]
- Els T-túbuls, que són invaginacions en la membrana cel·lular que assegurin la sincronicitat de la contracció, en el cas del múscul cardíac són més amples i curts, només es troben en el ventricle.
- El SR dels cardiomiòcits no té cisterna terminal.
- Les cèl·lules cardíques són dependents del metabolisme aeròbic.
- Cada cardiomiòcit té contacte amb altres cèl·lules en llocs especialitzats anomenats discs intercalats, on es troben situats uns canals anomenats unions de forat o "*gap junctions*", per on es transmeten directament certs ions.
- El múscul cardíac permet el pas de corrent elèctric entre cèl·lules.
- Les cèl·lules musculars cardíques contenen només un nucli a diferència de les del múscul esquelètic que són plurinucleades.

En la part funcional es diferencien en els següents aspectes:

- El teixit cardíac es contrau sense estimulació neuronal ja que depèn del teixit marcapassos.
- Les contraccions cardíques duren almenys 10 vegades més que les fibres musculars esquelètiques.
- Les propietats de les membranes cel·lulars també difereixen: les contraccions individuals en el cor no es sumen, fet que produeix que en el cor no es pugui mantenir la contracció.

Cal destacar que la inusual estructura dels miòcits ha portat als biòlegs cel·lulars a adoptar una nova terminologia a l'hora de parlar de certs òrgans de les cèl·lules. La majoria dels noms contenen l'arrel *sarc-* o *sarco-* que prové del grec *sark-*, *sarx*, que té com a significat teixit tou o carn (Taula 2).

Taula 2. Equivalència de la terminologia.

<b>Cèl·lules musculars</b>	<b>Altres cèl·lules</b>
Sarcoplasma	Citoplasma
Reticle sarcoplasmàtic (SR)	Reticle endoplasmàtic llis (SER)
Sarcosoma	Mitochondria
Sarcolemma	Membrana cel·lular

La Taula 3 recull informació sobre els principals òrgans, estructures i canals iònics dels miòcits cardíacs.

Taula 3. Noms dels principals orgànuls i canals cel·lulars del cardiomiòcits

NOM	LOCALITZACIÓ	FUNCIÓ
Receptors ( $\beta$ ,A2A...) Proteïna Gs Canals de calci tipus L (Cav1.2) Intercanviador sodi-calci NCX Canals de potassi $K_{channels}$ Canals de sodi $Na_{channels}$ T-túbuls	<b>Membrana</b>	Receptors de senyalització biològica (Ex. Estrès) Transmet el senyal dels receptors Entrada de calci al citosol Expulsa el calci de la cèl·lula que ha entrat pels Cav1.2 Repolaritzen la cèl·lula, expulsen el potassi Entra el sodi a la cèl·lula produint el pot. d'acció Invaginacions a la membrana, aug. velocitat del pot. d'acció
Adenilil Ciclasa Phosphodiesterases PDE Proteïna Kinasa A (PKA) Sarcòmer (actina i miosina)	<b>Citosol</b>	Transforma AMP $\rightarrow$ cAMP (cíclic) Trenquen l'enllaç ester de cAMP $\rightarrow$ AMP Promou la fosforilació de RyR2s, PLB i canals de $Ca^{2+}$ Unitat bàsica de contracció (línia Z a Z)
RyR2s SERCA i phospholamban	<b>Reticle Sarcoplasmàtic</b>	Alliberen el calci del SR al citosol Regulen la recollida del calci del citosol en el SR
Canals de RyR2 Serines	<b>RyR2s clústers</b>	Alliberen el calci del SR Llocs de fosforilació del canal de RyR2

En el teixit muscular cardíac s'hi poden diferenciar dos tipus de miòcits, els provinents de l'aurícula o auriculars, i els que es troben situats en els ventricles o ventriculars. Tal i com les cambres en el cor, presenten estructures i fisiologia diferents.

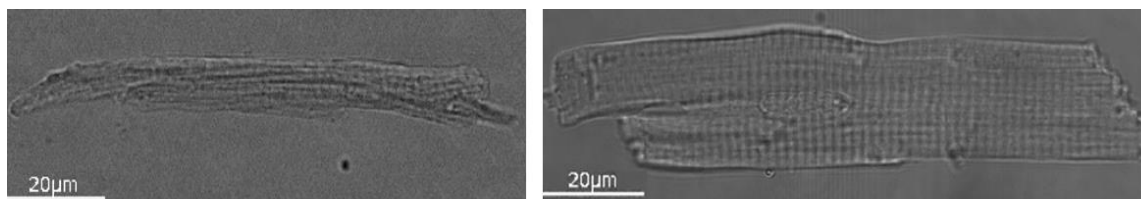


Figura 3. Miòcits de ratolí: El panell esquerra correspon a un miòcit auricular i el dret a un miòcit ventricular.

Les principals diferències entre els dos tipus de cardiomiòcits són [24][25]:

- Els miòcits ventriculars tenen una aparença més rectangular i estriada, en canvi els miòcits provinents de l'aurícula presenten una forma més arrodonida i allargada (Fig.3).
- La morfologia i estructura del SR dels miòcits ventriculars és més complexa i ramificada que en els miòcits auriculars.
- Els miòcits ventriculars tenen més T-túbuls, on els canals de calci tipus L (*L-type*) es solapen amb els receptors de rianodina (RyRs) (Fig. 4). En canvi els miòcits ventriculars tenen menys T-túbuls i per això s'observa més presència de bomber de sodi-calci i de RyRs al voltant de la membrana cel·lular. L'estructura que supleix els T-túbuls en els miòcits auriculars s'anomena tub axial transversal.
- Les *Línies Z*, distribució reticulada dels receptors que segueix les línies d'actina i miosina, conformen el sarcòmer del miòcits. En el ventricular estan més separades ( $\sim 1.8 \mu\text{m}$ ) que en el sarcòmer auricular ( $\sim 1.7 \mu\text{m}$ ).

- El senyal de calci dels miòcits ventriculars sorgeix amb aparença estriada degut als T-túbuls. Per contra, en els miòcits auriculars s'inicia en la membrana i es transmet cap a l'interior de la cèl·lula de forma centrípeta.

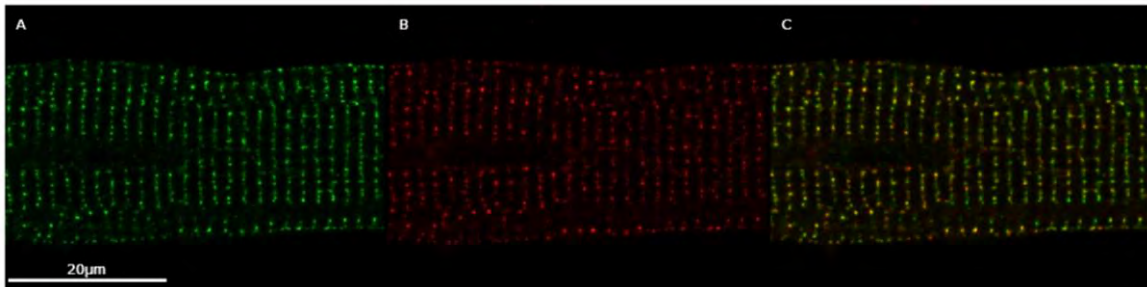


Figura 4. Imatges de fluorescència d'un miòcit ventricular de ratolí. A) Receptors de rianodina marcats genèticament amb GFP; B) Immunofluorescència dels canals de calci L-type; C) Solapament dels dos Canals de fluorescència.

### 1.4.2 Receptors de rianodina

Els receptors de rianodina són canals d'alliberament de calci que es troben en els teixits excitables, com ara el múscul llis, el múscul cardíac i en les neurones [26]. Per a cada tipus de teixit aquest receptor pren isoformes concretes que participen en cascades de reaccions diferents. En els cardiomiòcits s'hi troben els receptors de rianodina de tipus 2 (RyR2) (Fig. 5) són homotetràmers d'alt pes molecular compostos per quatre RyR2 polipèptids i quatre subunitats de proteïnes d'unió FK-506 (FKBP12.6) [27]. Aquestes subunitats FKBP12.6 són les responsables d'estabilitzar la funció del canal [28] i faciliten l'obertura coordinada dels canals veïns [29].

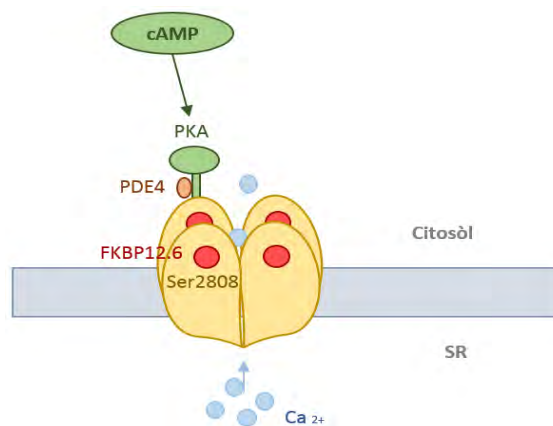


Figura 5. Receptor de rianodina cardíac.

Aquest receptors són els responsables d'alliberar el calci emmagatzemat en el SR al citosol través del procés anomenat alliberació de calci induïda per calci (CICR: *calcium-induced calcium-release*) [30][31]. En aquest procés, el calci emmagatzemat al SR és alliberat al citosol, on s'usarà en diverses cadenes de reaccions, com ara la contracció muscular [32].



Aquests receptors es conformen en agrupacions de RyR2s (RyRs o RyR2 clústers) i es troben distribuïdes en les cèl·lules homogèniament i seguint les estriacions del múscul cardíac. Les distribucions poden variar segons el tipus de cèl·lula: en les auriculars s'hi troben túbuls axials i en canvi les cèl·lules ventriculars disposen de T-túbuls. En diversos treballs s'ha realitzat la quantificació espacial d'aquests receptors, obtenint com a valors estàndards de separació entre els canals de RyR2s indicats en la Taula 4:

Taula 4. Distribució dels canals de RyR2s en els diferents tipus de cèl·lules [6][14].

	Aurícula	Ventriple
Transversal	0.97 $\mu\text{m}$	1.05 $\mu\text{m}$
Longitudinal	1.69 $\mu\text{m}$	1.87 $\mu\text{m}$

La mida típica d'una agrupació de receptors de rianodina (clúster) és de 250 nm, es calcula que donada aquesta mida, un clúster de RyRs consta d'aproximadament de 10 a 100 RyRs [25].

### 1.4.3 Activitat de calci

L'activitat mecànica dels cardiomiòcits és promoguda bàsicament per ions de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aquest influx de calci inicia el procés anomenat acoblament d'excitació-contracció (*Excitation-contraction coupling*), aquest petit augment de la concentració de calci al citosol activa els canals de receptors de rianodina i amb l'obertura d'aquests s'alliberen més ions provinents del reticle sarcoplasmàtic al citosol (*Calcium-Induced Calcium-Release CICR*) [30][31][33]. Gran part del calci alliberat al citoplasma s'unirà a la proteïna troponina C, permetent que les fibres d'actina i miosina puguin produir la contracció de la cèl·lula (Fig. 6). Durant la relaxació de la cèl·lula, les proteïnes ATPases SERCA (*Sarco Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*), recullen el calci romanent en el citosol i el transfereixen al lumen del SR. Aquest procés és possible gràcies a l'intercanviador de sodi-calci, que mitjançant la hidròlisi d'ATP, expulsa el calci fora de la membrana cel·lular, aprofitant el gradient de sodi.

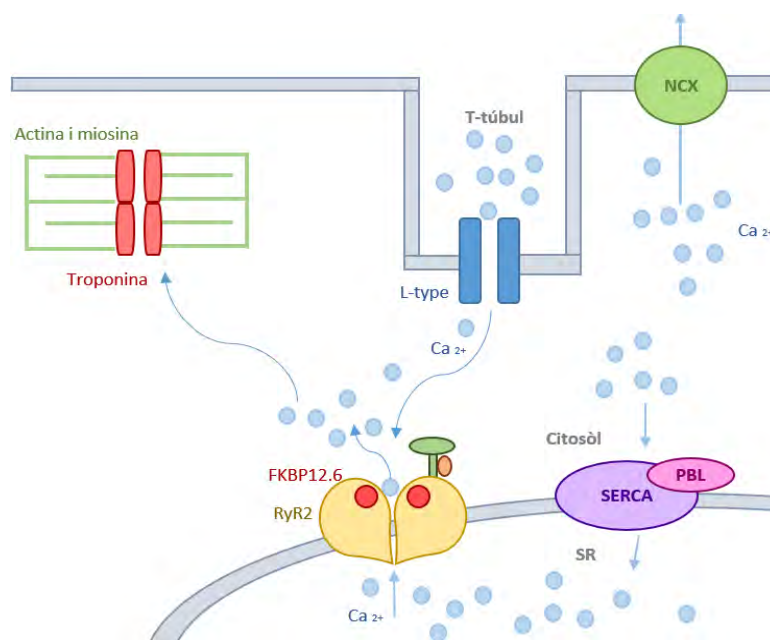


Figura 6. Procés d'alliberament de calci induït per calci (CICR).

L'activitat de calci en el citosol pot diferir segons la seva concentració i propagació a través de la membrana de la cèl·lula, donant lloc a diversos fenòmens amb propietats diferents i relacionats amb patologies diferents [2], [34]–[39]:

1. **Transients de calci (*transients*):** alliberament de calci coordinat en tota la cèl·lula, contracció simultània de tota la cèl·lula.
2. **Ones de calci (*waves*):** alliberament de calci no coordinat que es propaga a través de la cèl·lula. Provoquen una contracció descoordinada de la cèl·lula i poden depolaritzar les cèl·lules veïnes.
3. **Ones petites de calci (*mini waves*):** alliberament de calci que es propaga en una petita regió de la cèl·lula.
4. **Espurnes de calci (*sparks*):** alliberament espontani i localitzat de calci, generalment ocupa de 1 a 3 clústers de RyR2.

#### 1.4.4 Fosforilació de les serines dels receptors de rianodina

La fosforilació proteica és una modificació post-traducciona de proteïnes en què un d'aminoàcid és fosforilat per una proteïna quinasa mitjançant l'addició d'un grup fosfat. Aquest procés altera la conformació estructural de la proteïna, provocant que s'activi, es desactivi o modifiqui la seva funció. En els receptors de rianodina, l'enllaç del grup fosfat a certs aminoàcids s'enllaça a certs aminoàcids anomenats serines (Fig. 7) s'ha relacionat en diversos estudis amb major probabilitat d'obertura del canal de RyR i per tant amb l'augment d'alliberament de calci del SR[2][3]–[5].

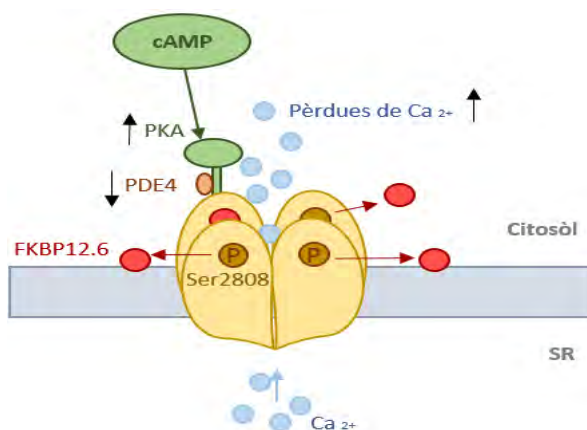


Figura 7. Canal de RyRs fosforilat.

Fins al moment, s'ha observat dues vies principals que promouen la fosforilació [36]. Per a cada una s'ha observat que el grup fosfat s'enllaça a serines diferents en cada un dels homotetràmers [4], [6], [40], [41]:

- **Fosforilació per PKA:** Ser-2808/2809 i Ser-2030 (humà/ratolí)
- **Fosforilació per CaMKII:** Ser-2808/2809 i Ser-2814/2815 (humà/ratolí)

Ambdues vies fosforilen també els canals de calci (*L-Type*) i el fosfolamban (PLB), que és l'encarregat de regular el SERCA, i fan que també s'augmenti la seva activitat [26], [42].

El procés de fosforilació a través de PKA (*Protein Kinase A*) segueix els següents passos (Fig. 8):

1. Estimulació de receptors de la membrana sarcoplasmàtica ( $\beta$ -AR).
2. Activació de la proteïna  $G_s$ .
3. La proteïna  $G_s$  activa l'AC, enzim encarregat de convertir l'AMP (adenocil monofosfat) en cAMP (adenocil monofosfat cíclic).
4. La presència de cAMP activa de l'enzim de la proteïna kinasa A (PKA).
5. La PKA promou la fosforilació dels canals de calci tipus-L, els RyRs i el PLB.

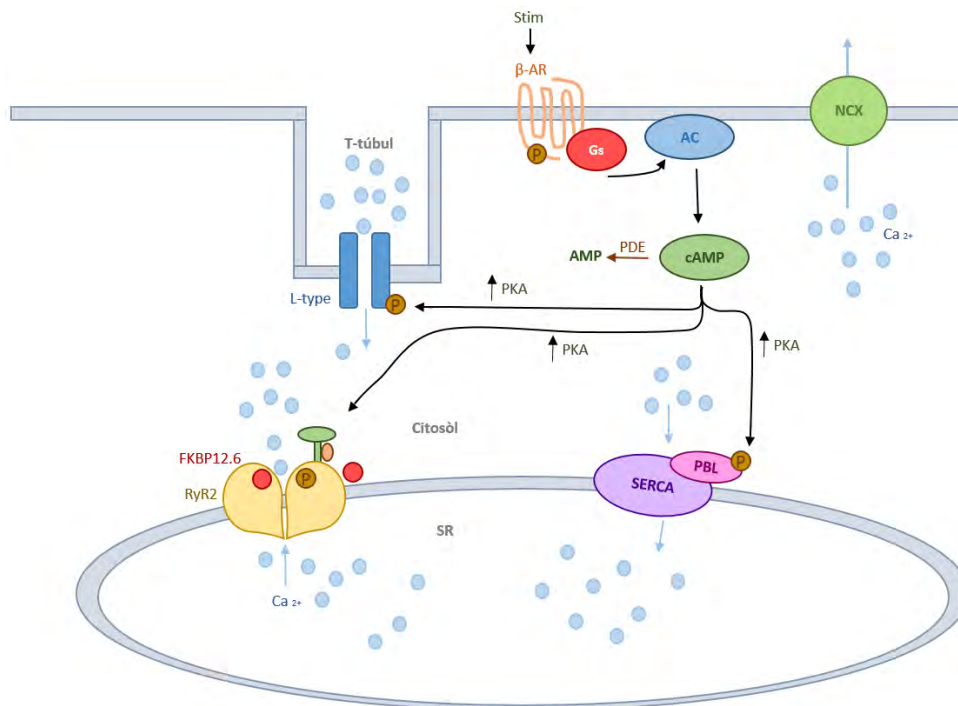


Figura 8. cAMP-dependent PKA pathway.

Els encarregats de regular o frenar aquesta fosforilació són la proteïna  $G_i$  que inhibeix a l'AC i, per tant, frena la producció de cAMP, o bé les fosfodiesterases (PDEs), que són les encarregades de trencar l'enllaç cíclic del cAMP. Hi ha quatre grups de PDEs principals presents en el teixit cardíac, PDE1, PDE2, PDE3 i PDE4. En estudis anteriors s'ha observat que el 90% de les PDEs de l'activitat d'hidròlisi de l'AMP cíclic ve donada per les PDE3 i PDE4 [43], [44]. Els fàrmacs més utilitzats per reproduir aquests canvis fisiològics en les cèl·lules cardíques són els següents [7], [9]–[11], [45]–[47]:

- **Isoproterenol / Isoprenaline (ISO):** estimula els receptors  $\beta$ -adrenèrgics de tipus 1 i 2.
- **Fenoterol (FENO):** estimula preferentment els receptors  $\beta$ -adrenèrgics de tipus 2 ( $\beta_2$ ).
- **Ro 20-1724 (RO) :** inhibeix PDE4, que es troba a prop dels RyRs.
- **Cilostamide (CIL):** inhibeix PDE3, que es troba a prop del SERCA.
- **Cyclopiazonic acid (CPA):** inhibeix el SERCA.

## 1.5 MODELS DE CARDIOLOGIA

---

En l'actualitat, per tal de predir el comportament fisiològic de les cèl·lules, que generalment és altament no lineal, és generen models matemàtics a partir de les últimes observacions extretes de la part experimental dels estudis de fisiologia cardíaca. Aquests models són de gran utilitat a l'hora de preveure com es comportarà una cèl·lula o organisme sotmesos a diferents condicions fisiològiques. Tanmateix, també poden ser utilitzats a l'hora de dissenyar la part experimental dels estudis, ja que et permeten jugar amb diferents concentracions dels fàrmacs que es volen estudiar. Els models generalment solen ser simulacions de imatges o senyals que s'obtidrien experimentalment amb el microscopi.

Els models es poden dividir en dos grups:

- **Models d'obertura dels canals** [33][48]
- **Models de dinàmica del calci:**
  - a) Simulació de *sparks* de calci en diferents condicions [49]–[53]
  - b) Simulació de *waves* segons l'activitat espontània de calci [54], [55]

## 1.6 OBTENCIÓ EXPERIMENTAL DE LES IMATGES

---

A l'hora de confirmar les hipòtesis teòriques o provinents de models matemàtics és recurrent utilitzar imatges per tal de verificar i comprovar que succeeix amb les condicions establertes segons la hipòtesis. La gran majoria dels estudis de ciència bàsica i fisiologia cel·lular s'utilitza la microscopia òptica, ja que la llum no pot malmetre els teixits *in vivo*. Tot i que per aprofundir en el reconeixement d'estructures es pot utilitzar microscopia electrònica en teixit *ex vivo* [4][56].

Els mètodes d'obtenció d'imatges òptiques permeten visualitzar canvis en les proteïnes i en l'estructura cel·lular. En el cas de les tècniques de fluorescència, s'utilitzen marcadors que s'exciten amb llum visible o ultraviolada, i emeten llum en una altra longitud d'ona menys energètica també de l'espectre visible (taula 5 i Fig. 9). En aquest apartat es descriuran els mètodes de preparació de les mostres i els principals tipus de microscopis de fluorescència.

Taula 5. Longituds d'ona i freqüències de l'espectre visible.

Color	Interval de longitud d'ona	Freqüència
Violat	~380 a 430 nm	~ $7,5 \cdot 10^{14}$ Hz
Blau	~430 a 500 nm	~ $6,7 \cdot 10^{14}$ Hz
Cian	~500 a 520 nm	~ $6,0 \cdot 10^{14}$ Hz
Verd	~520 a 565 nm	~ $5,5 \cdot 10^{14}$ Hz
Groc	~565 a 590 nm	~ $5,0 \cdot 10^{14}$ Hz
Vermell	~625 a 740 nm	~ $4,3 \cdot 10^{14}$ Hz

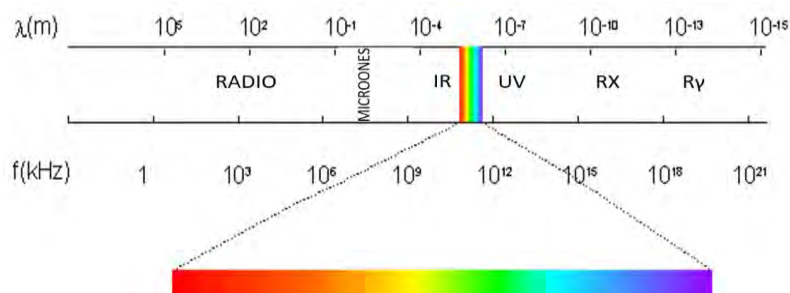


Figura 9. Espectre visible

## 1.6.1 Preparació de les mostres

Per tal d'observar i estudiar certes estructures de proteïnes específiques subcel·lulars amb microscopia de fluorescència, aquestes hauran de ser prèviament marcades per emetre fluorescència. Hi ha diversos mètodes per realitzar aquest marcatge, en aquest apartat s'esmentaran els més utilitzats.

### 1.6.1.1 Immunofluorescència

La immunofluorescència és una tècnica que permet identificar proteïnes o estructures subcel·lulars en mostres clíniques o biològiques. Aquesta tècnica es basa en el marcatge dels anticossos monoclonals o antiimmunoglobulines específiques amb compostos fluorescents. La reacció d'aquests anticossos marcats amb els seus antígens corresponents (proteïnes d'interès) dona lloc a immunocomplexos que es poden observar al microscopi de fluorescència. Les molècules de colorants fluorescents (fluorocroms), al ser excitées amb energia electromagnètica d'una longitud d'ona apropiada, emeten radiació de major longitud d'ona, fàcilment detectable. Aquest procés és degut a l'excitació dels electrons de capes inferiors, que un cop excitats passen a capes superiors i, quan decauen un altre cop a capes inferiors és quan emeten l'ona de freqüència inferior a la d'excitació.

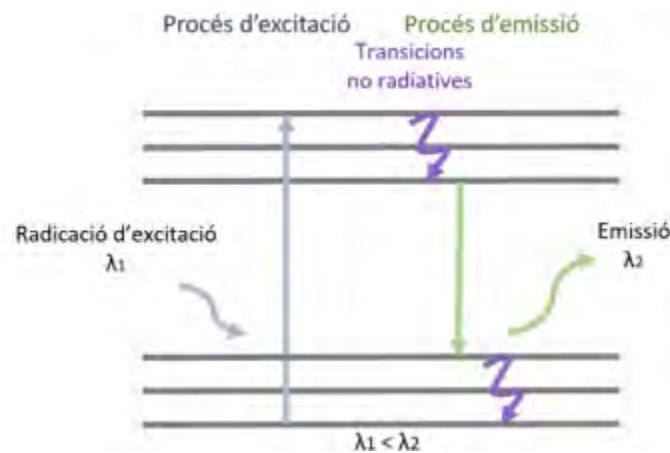


Figura 10. Excitació i emissió fluorescència.

Hi ha diversos tipus de fluorescència:

- **Directa o primària:** l'anticòs s'enllaça directament a la proteïna i emet fluorescència (Fig. 11A).
- **Indirecta o secundària:** s'usen dos anticossos, un específic per a la proteïna de la cèl·lula i un de secundari que detecta al primari i emet llum (Fig. 11B).

Aquesta tècnica té múltiples aplicacions a l'hora de visualitzar virus, bacteris i estructures cel·lulars [57], [58].

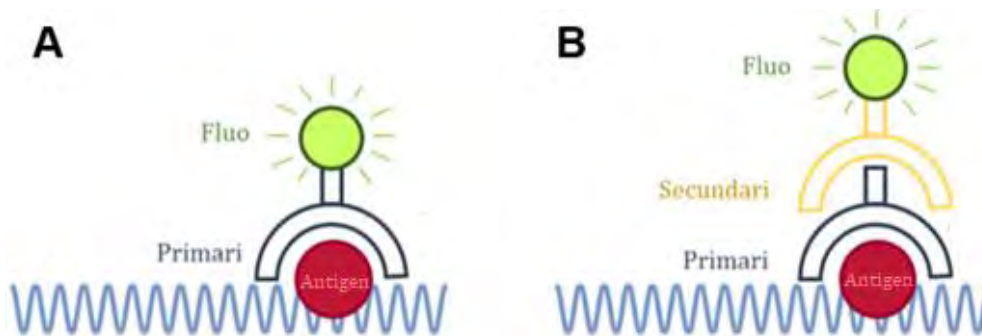


Figura 11. Immunofluorescència, els anticossos detecten l'antigen localitzat en la membrana cel·lular: A) Directa, un sol anticòs. B) Indirecta, anticòs primari detecta l'antigen i el secundari detecta el primari.

### 1.6.1.2 Indicadors fluorescents de ions

Els indicadors fluorescents són molècules petites que tenen gran afinitat per a ions específics. Un cop s'ha realitzat la unió aquestes molècules canvien les seves propietats espectrals i per tant permeten mostrar l'estat dels ions d'un teixit o de cèl·lules, com per exemple els miòcits [59].

Per a la detecció de concentració de calci lliure en el citosol s'utilitzen els homòlegs fluorescents de molècules EGTA o BAPTA, que tenen una alta selectivitat i afinitat pels ions de calci [60]. Cada indicador de fluorescència s'excitarà donada una longitud d'ona i emetrà en una altra d'un estat menys energètic. Els indicadors més comuns en imatge de fluorescència de calci i les seves longituds d'ona són els següents (Ex/Em): fura-2 (360/510 nm), indo-1 (350/400-470 nm), fluo-3, fluo-4 (488/525nm), CAL-590 (543/580 nm) i (Rhod-2 (522/581 nm) [61], [62].

### 1.6.1.3 Proteïnes fluorescentes

Els avenços en l'enginyeria genètica en les darreres dècades han permès modificar l'ADN per tal de que certes proteïnes es manifestin com a fluorescentes. Generalment s'utilitza la proteïna verda fluorescent (GFP), produïda per la medusa *Aequorea victoria*. Aquesta molècula emet fluorescència en la zona verda de l'espectre visible de la llum quan és exposada al rang de llum visible entre blava fins a ultraviolada. El gen d'aquesta medusa s'utilitza en biologia molecular com a marcador [63], [64], ja que es pot introduir en l'ADN d'altres espècies i, seleccionant la regió adequada, pot ser utilitzat com a indicador específic d'aquestes proteïnes. La tècnica en qüestió permet observar des d'òrgans [65], infeccions víriques [66], fins a estructures de proteïnes específiques [67].

### 1.6.2 Microscopia de fluorescència

La microscopia de fluorescència és microscopia òptica que utilitza la fluorescència per estudiar les propietats d'objectes orgànics o inorgànics. La fluorescència que s'usa com a font d'il·luminació s'obté generalment d'un làser de llum òptica. El disseny més simple és el microscopi d'epifluorescència i entre els més complexos es situa el microscopi confocal.

La mostra que es vol visualitzar és il·luminada o excitada a una longitud d'ona específica, que és absorbida pels fluoròfors, fent que aquests emetin llum en una longitud d'ona més gran.

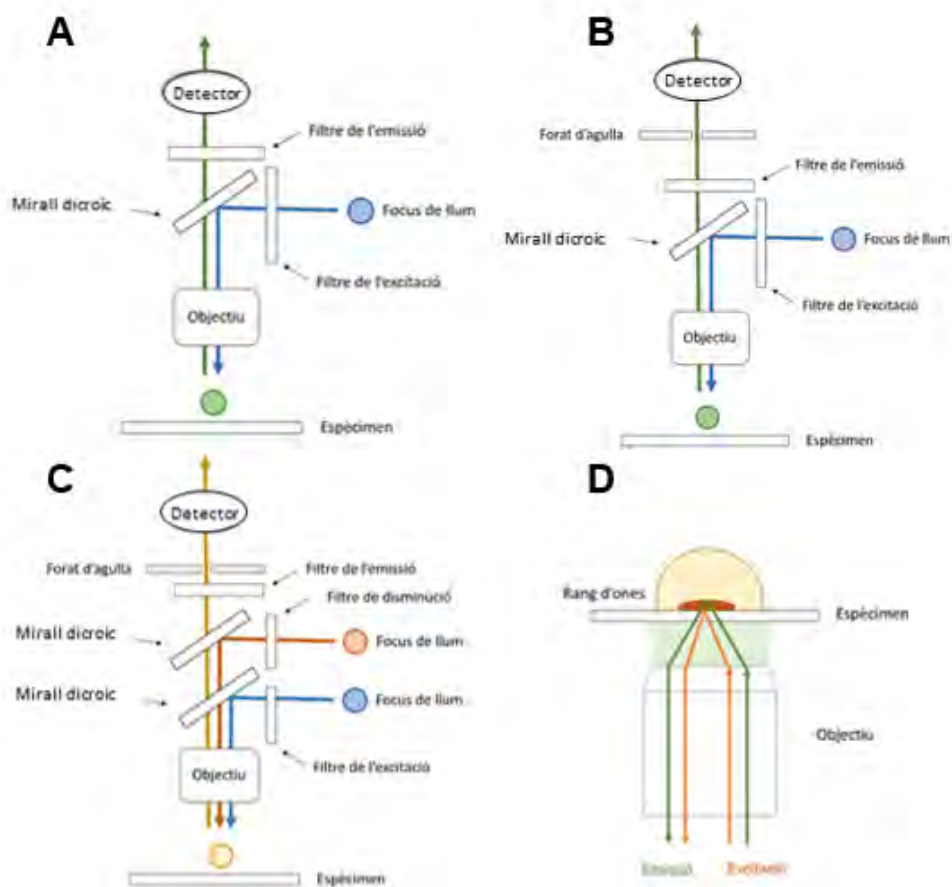


Figura 12. Microscopia de fluorescència: A) Epifluorescència. B) Confocal. C) STED. D) TIRF.

### 1.6.2.1 Microscopia confocal

El principi del microscopi confocal va ser patentat el 1957 per Marvin Minsky [68], amb l'objectiu de millorar algunes limitacions dels microscopis de fluorescència tradicionals, permetent observar amb més resolució i detall les mostres. La principal diferència és que el confocal incorpora forat d'agulla, anomenat *pinhole*, situat en un pla conjugat a la mostra davant del detector per eliminar el senyal fora de focus, i és per aquesta configuració que ha pres aquest nom "confocal" (Fig. 12B). El *pinhole* en qüestió, permet discernir de la llum reflectida fora del pla focal que es vol observar, reduint la porció de llum que prové d'altres plans de la cèl·lula i obtenint com a resultat una millor resolució espacial.

La resolució d'un microscopi òptic (Eq. 1) es defineix com la distància més curta entre dos punts que encara es poden distingir per l'observador. Quan es treballa amb resolucions tan petites com amb els microscopis de fluorescència apareix la problemàtica de la *point spread function* i el límit de difracció, visualitzant-se com a discs d'Airy amb anells al voltant (Fig. 13). Un disc d'Airy és el punt de llum centrat de manera òptima que pot ser determinat per una obertura circular en un sistema perfectament alineat limitat per difracció, que vindrà donat segons el diàmetre del forat d'agulla i la longitud d'ona (Eq. 1). Vist des de dalt (Fig. 13, sup.), apareix com a un punt de llum rodejat per anells concèntrics. El patró de difracció es determina per la longitud d'ona de la llum i la mida de l'obertura a través de la qual passa la llum. El punt central del disc d'Airy conté aproximadament 84% de la intensitat lluminosa amb el 16% restant en el patró de difracció al voltant d'aquest punt. Per descomptat, hi ha molts punts de llum en una mostra tal com s'observa amb un microscopi i, per tant, és més apropiat pensar en termes de nombrosos patrons Airy en lloc d'un únic punt de llum.

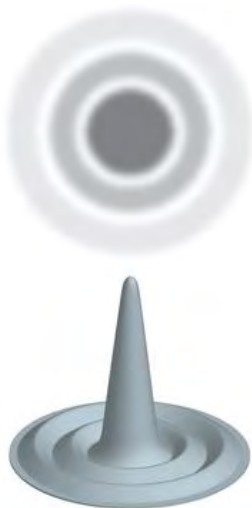


Figura 13. Discs d'Airy i patrons de difracció [69].

$$d = \lambda/2 \cdot NA \quad (1)$$

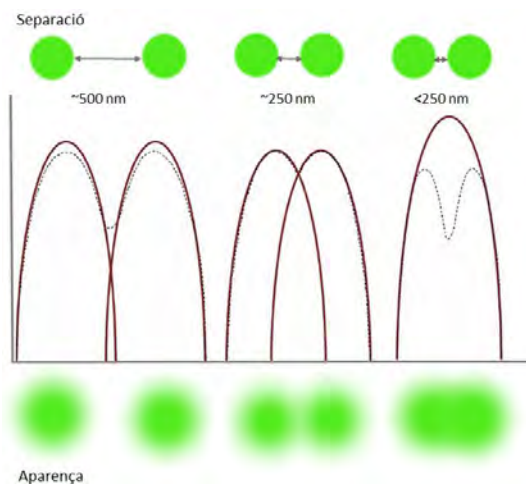


Figura 14. Definició de la resolució i els límits de l'habilitat per diferenciar punts [70].



### 1.6.2.2 STED

La microscopia de l'esgotament d'estats excitats per emissió estimulada (STED) és una de les tècniques que componen la microscopia de superresolució. És una tècnica funcional determinista que explota la resposta no lineal de fluoròfors utilitzats per etiquetar mostres biològiques per tal d'aconseguir una millora en la resolució, és a dir, permet captar imatges amb resolucions per sota del límit de difracció. Aquest tipus de microscopia crea imatges de superresolució mitjançant la desactivació selectiva de fluoròfors, minimitzant l'àrea de la il·luminació en el punt focal, i millorant així la resolució assolible per a un sistema donat. Va ser desenvolupat per Stefan W. Hell i Jan Wichmann el 1994 [71]. Com ja s'ha esmentat, funciona disminuint la fluorescència en regions específiques de la mostra, deixant una taca focal en el centre actiu per emetre fluorescència. El làser de disminució (Fig. 12C) excita els electrons circumdants a la mostra, reduint l'emissió de fluorescència. L'exemple més comú d'aquests elements òptics difractius, és una doble campana o anell al voltant del disc d'Airy. La zona vermella és la que s'esgota, mentre que el punt verd central deixa actiu (Fig. 15). Aquests elements òptics difractius es generen per una polarització circular del làser de disminució, combinat amb una rampa de fase helicoidal. La resolució lateral d'aquests elements es situa entre 10 i 70 nm.

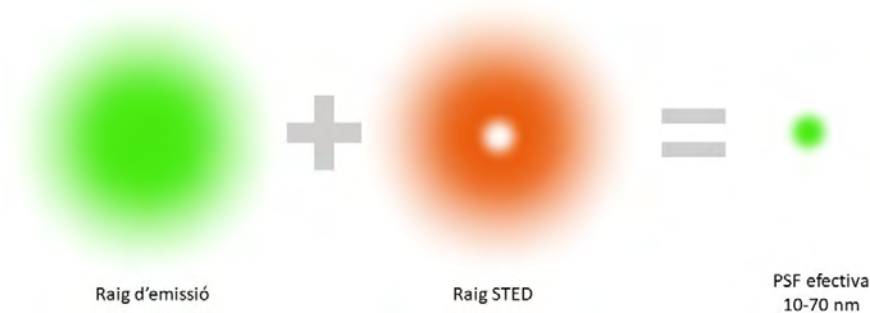


Figura 15. Generació de la PSF efectiva més petita que el límit de difracció utilitzant STED.

### 1.6.2.3 TIRF

Aquesta tècnica va ser descrita per primera vegada per E.J. Ambrose el 1956 [72]. El microscopi TIRF utilitza una ona evanescent per il·luminar i excitar fluoròfors en una regió restringida de la mostra adjacent a la interfície vidre-aigua (Fig. 12D). Es genera l'ona evanescent només quan la llum incident és totalment reflectida internament en la interfase de vidre-aigua. El camp electromagnètic evanescent decau exponencialment des de la interfície, i per tant penetra a una profunditat de només aproximadament 100 nm en el medi de mostra. Així, el TIRF permet una visualització selectiva de zones de la superfície tal com la membrana plasmàtica de les cèl·lules. Cal dir, però, que la regió visualitzada és almenys uns pocs centenars de nanòmetres d'ample, de manera que la zona citoplasmàtica de sota de la membrana plasmàtica també es visualitza, a més de la membrana plasmàtica durant la microscopia TIRF. La visualització selectiva de la membrana plasmàtica fa que les característiques i esdeveniments a la membrana en les cèl·lules es puguin captar amb alta resolució axial amb l'espècimen viu.

## 1.7 MÈTODES DE PROCESSAMENT DE LES IMATGES

---

En biologia molecular és molt comú utilitzar imatges per tal de veure com evolucionen els marcadors de fluorescència que fan referència a processos fisiològics. Per caracteritzar aquestes imatges i per extreure'n dades que representin informació rellevant sobre aquests esdeveniments fisiològics són necessàries tècniques de processament d'imatge.

En l'actualitat, per a l'estudi de l'activitat de les cèl·lules cardíaques, ja s'usen tècniques per analitzar les imatges, com ara els llinars d'intensitat per tal de detectar els *sparks* i caracteritzar la seva amplitud, tant en *line scan* [73], com amb *frame scan* [74], [75], i utilitzant diferents programaris com ara l'ImageJ [76].

Les tècniques de registre d'imatges per estudiar l'activitat les cèl·lules al llarg de temps són:

- **Line Scan o escanejat de línia:** on es capta l'activitat d'una línia de píxels (N) de la cèl·lula durant un període de temps (x,t).
- **Frame Scan o escanejat de fotogrames:** on es capta l'activitat d'una cèl·lula amb fotogrames (N x M píxels) en un període de temps (x,y,t).

En aquest apartat es realitzarà una breu descripció d'algunes de tècniques que s'apliquen en l'actualitat a les imatges digitals amb l'objectiu de millorar-ne la qualitat o facilitar la recerca d'informació i característiques de les imatges.

### 1.7.1 Normalització i estat basal

Les imatges experimentals obtingudes en els laboratoris poden contenir molta variabilitat entre elles, per això és important aplicar una normalització de les imatges. Aquest procés permet realitzar comparacions de les característiques de les imatges malgrat que aquestes siguin lleugerament diferents nivell d'intensitats, per exemple si la intensitat de píxel està més saturada en una imatge que en una altre [77].

Generalment, en imatges estàtiques s'utilitza el següent mètode (Eq. 2):

$$I_{norm} = k \cdot \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \quad (2)$$

On,  $I_{norm}$  és la imatge final normalitzada,  $k$  és el valor màxim que prendrà la normalització,  $I$  és la imatge amb els valors de píxels original i,  $I_{min}$  i  $I_{max}$  són els valors mínim i màxim de la imatge. Aquests últims poden ser valors absoluts o estadístics, com ara el valor del quantil inferior a l'1% i superior al quantil 99% de l'histograma. Cal vigilar perquè depenent de com s'escullin aquests valors es poden tenir normalitzacions no desitjades.

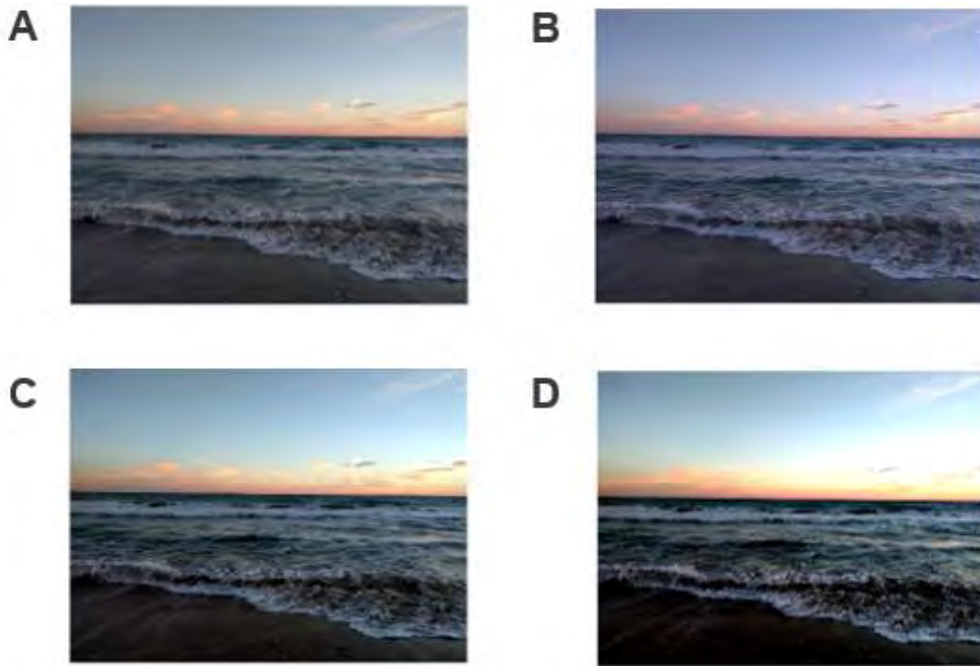


Figura 16. Normalització. A) Imatge original. B) Imatge normalitzada amb el min i max absoluts. C) Imatge normalitzada segons els quantils 1% i 90%. D) Imatge normalitzada segons els quantils 10% i 90%.

L'equivalent d'aquesta normalització d'imatges en els senyals és, Eq. (3) [74]:

$$F_{norm} = \frac{\Delta F}{F_o} \quad (3)$$

Essent,  $\Delta F$  la diferència de fluorescència entre la intensitat de fluorescència màxima menys la intensitat mínima inicial del senyal,  $F_o$  l'estat basal del senyal i  $F_{norm}$  la fluorescència normalitzada. La problemàtica d'usar aquest  $\Delta F$  resideix en si s'obtenen senyals ( $F_1$ ) amb amplituds més petites, donada la fisiologia de la cèl·lula, i es comparen amb senyals ( $F_2$ ) que tenen amplituds de naturalesa fisiològica més grans acompanyades per amplituds més petites com en el cas anterior, per tant classificarà els esdeveniments amb amplituds petites de  $F_1$  com a esdeveniments de la mateixa amplitud que els grans de  $F_2$ .

És per aquest motiu que en el cas dels senyals generalment es fa servir, Eq. 4, que simplement traslladar el valor mínim dels senyals al zero, sense modificar les amplituds d'aquestes:

$$F_{norm} = \frac{F}{F_o} \quad (4)$$

Essent,  $F$  la fluorescència inicial del senyal,  $F_o$  l'estat basal i  $F_{norm}$  la fluorescència normalitzada.

També en aquest cas ens trobem diferents maneres d'estimar l'estat basal ( $F_o$ ) del senyal, que és l'estat de repòs i amb manca d'esdeveniments. Pot ser expressat com un valor fixe estimat mitjançant el quantil inferior a un percentatge (1%, 5%...) de l'histograma de la imatge o del senyal, o bé remouent els esdeveniments i calculant la mitjana o mediana dels trams sense esdeveniments. També es pot obtenir amb valors variables en funció del temps, essent cada punt el valor mitjà de l'estat basal del senyal dintre d'una finestra temporal curta (*moving average*) [78].

## 1.7.2 Estimació del soroll i filtratge

Les principals formes d'estimar el soroll són, estimar les seves variacions de l'estat basal del senyal, com ara amb la desviació estàndard ( $\sigma_1$ ) (Eq. 5) [79], o bé amb la desviació absoluta de la mediana (MAD) de la imatge (Eq. 6). Aquesta última s'utilitza per realitzar una estimació de la desviació estàndard més robusta ( $\sigma_2$ ).

$$\sigma_1 = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (5)$$

$$MAD = \text{mediana}(|x_i - \text{mediana}(x)|) \quad (6)$$

On,  $n$  és el nombre de mostres,  $x_i$  és la mostra  $i$  i  $\bar{x}$  la mitjana.

$$\sigma_2 = k \cdot MAD \quad (7)$$

On,  $k$  és una constant amb valor  $k = 1.4826$ .

L'estimació del soroll és en el tractament d'imatges el pas predecessor del filtratge de les imatges. El filtrat consisteix en disminuir o eliminar el soroll de la imatge, o millorar-ne la qualitat. Existeixen múltiples tipus de filtres, en els diferents dominis:

- **Espacial:** mediana, moda, màxims i mínims, mitjana i promitjat.
- **Freqüencial:** passa baix, passa alts, passa banda.
- **Temps-Freqüència:** Wavelet

A continuació es realitzarà una explicació dels filtres més destacats en cada domini.

### Filtres d'ordre

Aquest és un exemple de filtre estadístic espacial i no lineal. Amb aquesta tècnica es poden obtenir molt bons resultats, ja que, amb els paràmetres adequats, permet preservar els detalls de la imatge. Els passos a seguir són els següents:

1. Definir una Regió d'Interès (ROI, acrònim de *Region Of Interest*).
2. Ordenar els valors de cada píxel inclòs dintre de la ROI i obtenir-ne la mediana.
3. Assignar el valor de la mediana al píxel central.

Generalment s'utilitzen els valors d'estimació de soroll per dissenyar aquest filtre, com més soroll més gran haurà de ser la ROI i per obtenir un efecte més suavitzat. En la Figura 16 es mostra com varia la imatge segons la mida de la ROI.



Figura 17. Filtratge mediana.

### Transformada de Fourier

Per a filtrar les imatges en el domini freqüencial el primer pas és traslladar la imatge de domini espacial a freqüencial, aquesta acció es realitza mitjançant la transformada de Fourier o la transformada de Fourier ràpida (FFT). Tant en els senyals com en les imatges es treballarà amb la Transformada de Fourier Discreta donat que l'obtenció de les dades és realitza de forma discretitzada. Treballar en aquest domini permet certes simplificacions matemàtiques, una de les seves propietats consisteix en que les convolucions comptes de ser una integral passen a ser una simple multiplicació.

L'equació que descriu la FFT en dues dimensions (Eq. 8) per passar d'una imatge,  $f(x,y)$ , del domini espacial al domini temporal,  $F(u,v)$  és la següent:

$$F(u, v) = \frac{1}{M N} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) e^{-j2\pi(u x/M + v y/N)} \quad (8)$$

La transformada en dues dimensions consisteix en una matriu complexa i implica realitzar la transformada en cada dimensió tantes vegades com nombre de píxels  $x$  i  $y$  tingui la imatge. Més precisament, es fa mitjançant la transformació cada fila, la qual substituirà a la corresponent fila en la imatge, a continuació es realitza la transformació de cada columna, i s'intercanviarà cada columna de la imatge per la seva transformada (Fig. 18 i Fig. 19).

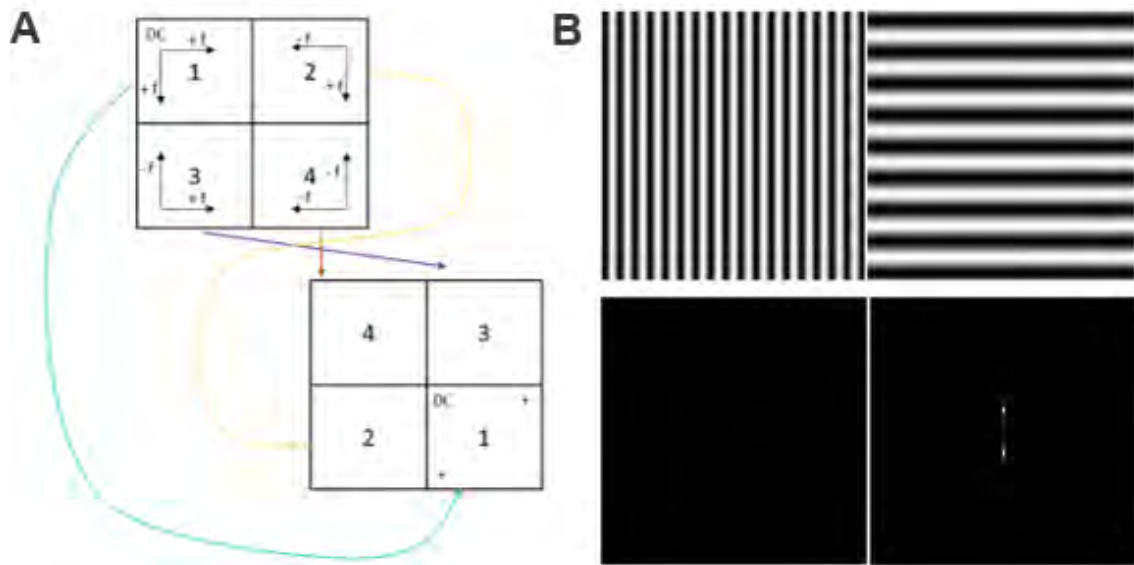


Figura 18. A) Distribució de les freqüències en els quadrants de la imatge ( $DC \rightarrow f = 0$ ). B) Exemples: Imatges originals a la part superior i FFTs de les mateixes a la part inferior.

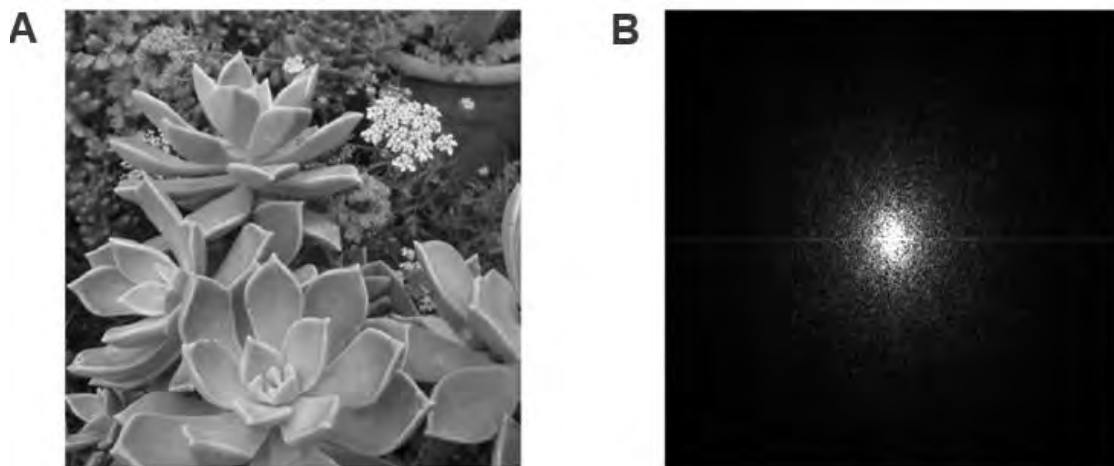


Figura 19. Exemple de FFT per a una imatge. A) Imatge Original. B) Transformada de Fourier de la imatge.

El disseny de filtres es fa exclouent les freqüències que generen soroll en la imatge, depenent de la banda de freqüència escollida s'obtidran diferents resultats. Si s'escull que es mantinguin les freqüències baixes (Fig. 20A), utilitzant un filtratge passa baixos o filtratge de mitjana, la imatge passarà a ser més suavitzada (Fig. 20B). En canvi, mantenint les altes freqüències (Fig. 20C), s'augmenta el soroll però és milloren els contorns de la imatge (Fig. 20D).

Si apliquem un filtratge passa baixos (Fig. 20A) o un passa alts (Fig. 20C) obtenim els següents resultats:

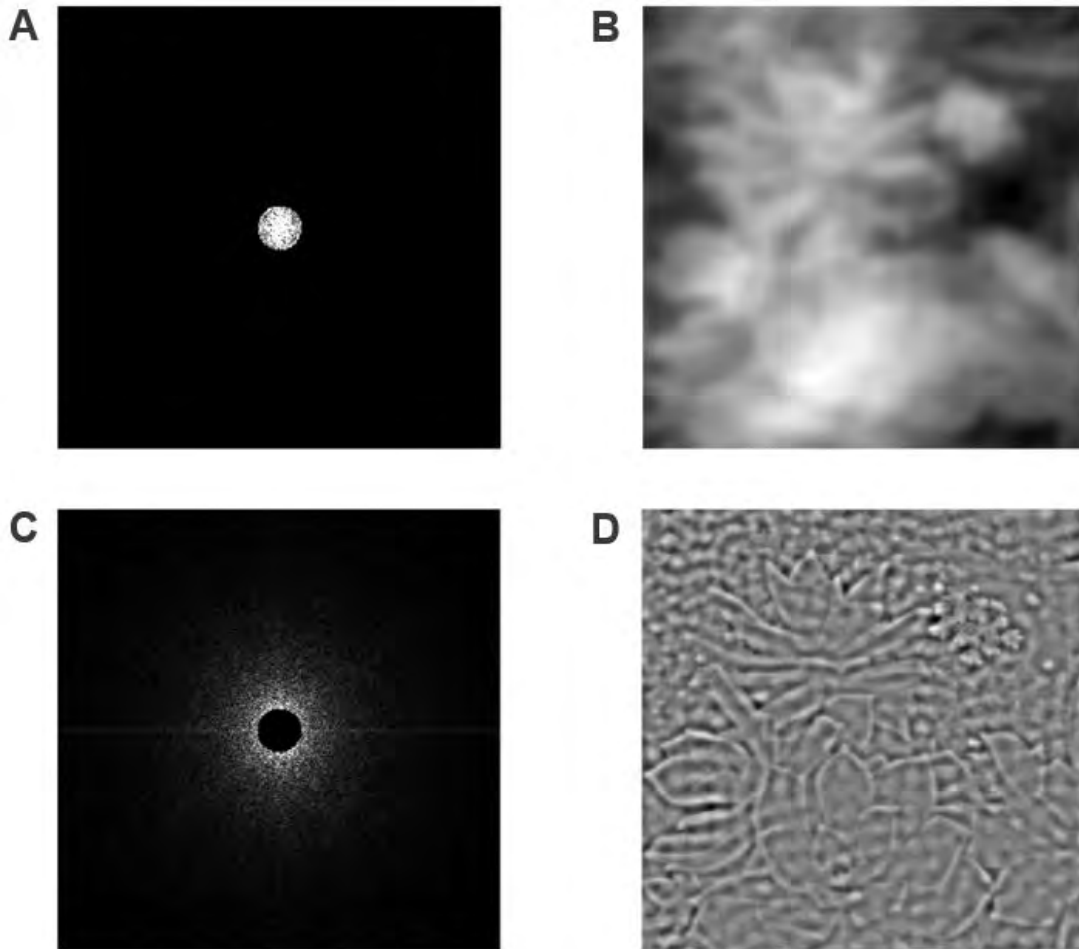


Figura 20. Filtres i imatges filtrades. A) Filtre passa baixos, B) Imatge filtrada amb el filtre passa baixos. C) Filtre passa alts. D). Imatge filtrada amb el filtre passa alts.

### Transformada wavelet

Les transformades *wavelets* són considerades formes de representació temps-freqüència dels senyals continus en el temps i també estan relacionades amb els anàlisis d'harmònics. La idea fonamental és que la transformació només hauria de permetre canvis en l'extensió del temps, però no en la forma, essent important la funció base que s'escull (Fig. 21).

S'espera que els canvis en l'extensió del temps s'ajustin al corresponent anàlisi freqüencial de la funció base, basant-se en el principi d'incertesa,

$$\Delta t \Delta \omega \geq 1/2 \quad (9)$$

On  $t$  representa el temps i  $\omega$  la freqüència angular ( $\omega=2\pi f$ , on  $f$  és la freqüència temporal).

Si es busca una bona resolució temporal, s'obindrà una baixa resolució freqüencial. L'extensió escollida de la finestra de l'anàlisi més llarga serà el valor del suport temporal o diferència entre els temps,  $\Delta t$ . En altres paraules, la funció base pot ser considerada com a resposta a un impuls del sistema on la funció  $x(t)$  ha estat filtrada. El senyal transformat aporta informació del temps i la freqüència. Per tant, la transformada *wavelet* conté informació similar a la transformada de Fourier

en un temps curt, però amb propietats addicionals de les *wavelets*, com ara que té més resolució en el temps en anàlisis d'altres freqüències.

Es pot utilitzar en imatges com amb la transformada de Fourier, per filtrar en el domini de la freqüència, però amb els avantatges de la *wavelet*, és molt útil a l'hora de detectar contorns o filtrar soroll d'alta freqüència [75].

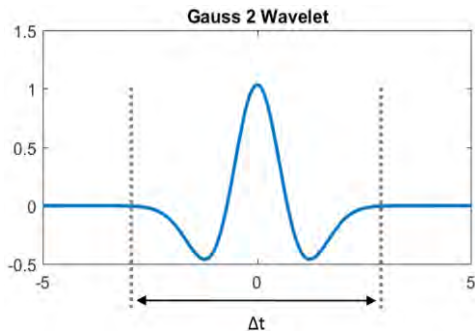


Figura 21. Funcions base de la transformada *wavelet*.

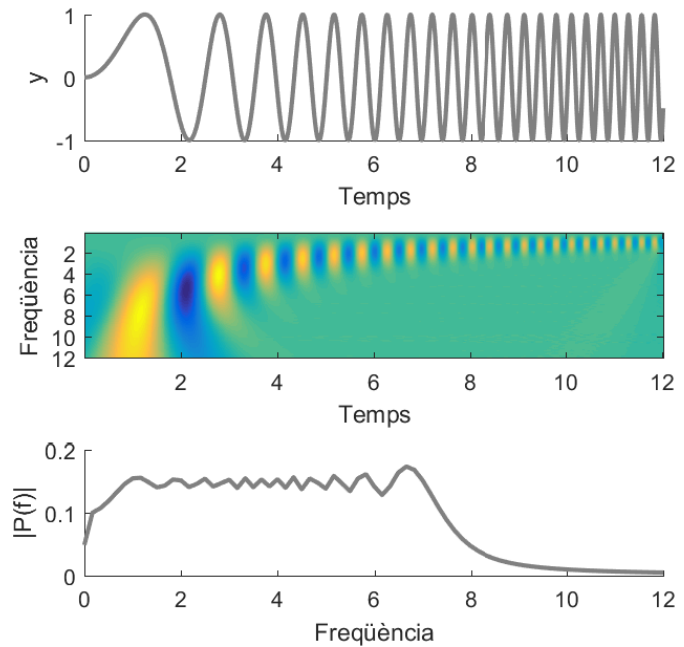


Figura 22. Diferències entre la resolució temporal a altes freqüències entre la FT i WT.

### 1.7.3 Mètodes de segmentació

La segmentació consisteix en dividir la imatge en diferents regions etiquetades, amb l'objectiu de simplificar el problema o canviar la representació de la imatge per una més significant. Generalment s'utilitza per detectar objectes o contorns. Es tracta d'un dels primers processos de l'anàlisi d'imatges i té un gran impacte en els resultats d'aquests. Per tant, el reconèixer patrons o objectes es tracta d'un procés no trivial i sovint amb fortes connotacions subjectives depenent de en quines condicions que es realitzi. Actualment es disposa d'una gran varietat de mètodes de segmentació, com ara: per llinar, per creixement de regions, per conques d'aigua, per intensitat de color, per detecció dels contorns, per mètodes d'agrupament, etc. En aquest apartat es descriuran dos dels múltiples mètodes de segmentació: la segmentació per llinar d'intensitat i la segmentació per conques hidrogràfiques (*Watershed*).



## Segmentació per llindar

La segmentació per llindar d'intensitat de nivell de grisos o *thresholding* és el mètode més simple d'etiquetar imatges. Es parteix d'una imatge en escala de grisos, podria ser la d'un canal de color RGB, i en base a la distribució de l'histograma o de les propietats de la mateixa, s'escull un llindar. Aquest actuarà com a frontera per transformar la imatge en binària, i.e. assignant blanc als píxels que estan per sobre el llindar i negre els que estan per sota.

Les propietats en que es basen els llindars són [56]:

<b>Forma de l'histograma</b>	Segons els pics o valls d'aquesta o distribució, el llindar pot ser escollit manualment o automàticament (mètode d'Otsu).
<b>Mètodes d'agrupament</b>	El nivells de grisos similars són agrupats en dues parts com a rerefons o objecte, o són modelats com a una barreja de dues gaussianes.
<b>Forma de l'histograma</b>	Segons els pics o valls d'aquesta o distribució, el llindar pot ser escollit manualment o automàticament (mètode d'Otsu).
<b>Mètodes basats en l'entropia</b>	Obté les regions basant-se en l'entropia, per diferenciar fons de la imatge i objectes.
<b>Atributs d'objectes</b>	Busca una mesura de similitud entre el nivell de gris i les imatges binaritzades, com la similitud confusa ( <i>fuzzy</i> ) de la forma, coincidència en els contorns, etc.
<b>Mètodes espacials</b>	Utilitzen la probabilitat de distribució i/o correlació entre els píxels.
<b>Mètodes locals</b>	Adapten el valor del llindar per a cada píxel basant-se en les característiques locals de la imatge.

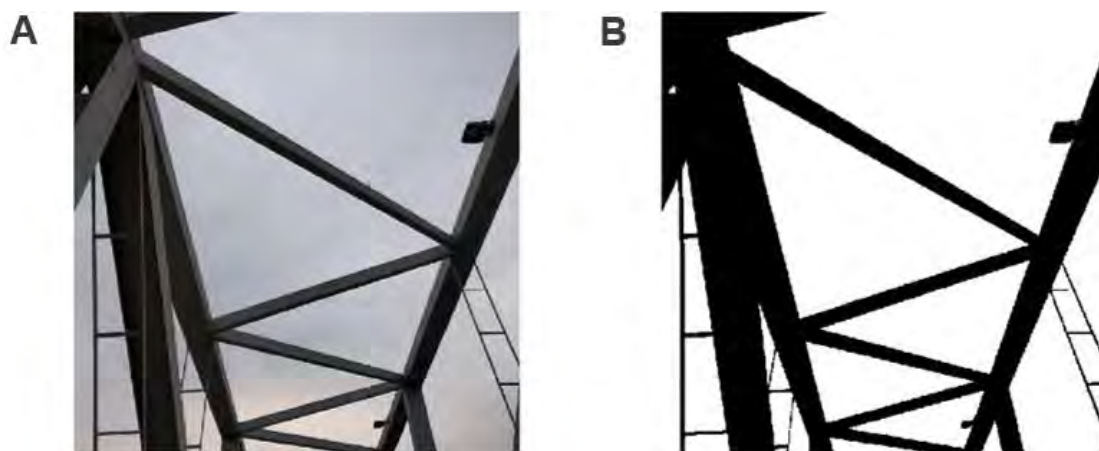


Figura 23. Exemple imatge segmentada per llindar. A) Imatge original. B) Imatge un cop aplicat el llindar.

## Watershed

La tècnica *watershed* o segmentació per conques hidrogràfiques consisteix en una transformació definida pel nivell de gris de la imatge. El nom d'aquest mètode fa referència metafòricament a una conca d'aigües o una conca geològica, que separa les conques adjacents. Aquest mètode tracta la imatge com si es fos d'un mapa topogràfic, definint la brillantor com a alçada i trobant les línies divisòries en les valls del mapa topogràfic d'intensitat de píxels.

Existeixen diferents definicions del *watershed*:

- Per inundació
- Segons la distància topogràfica
- Segons el principi de la gota d'aigua
- Inter-píxel Topològic

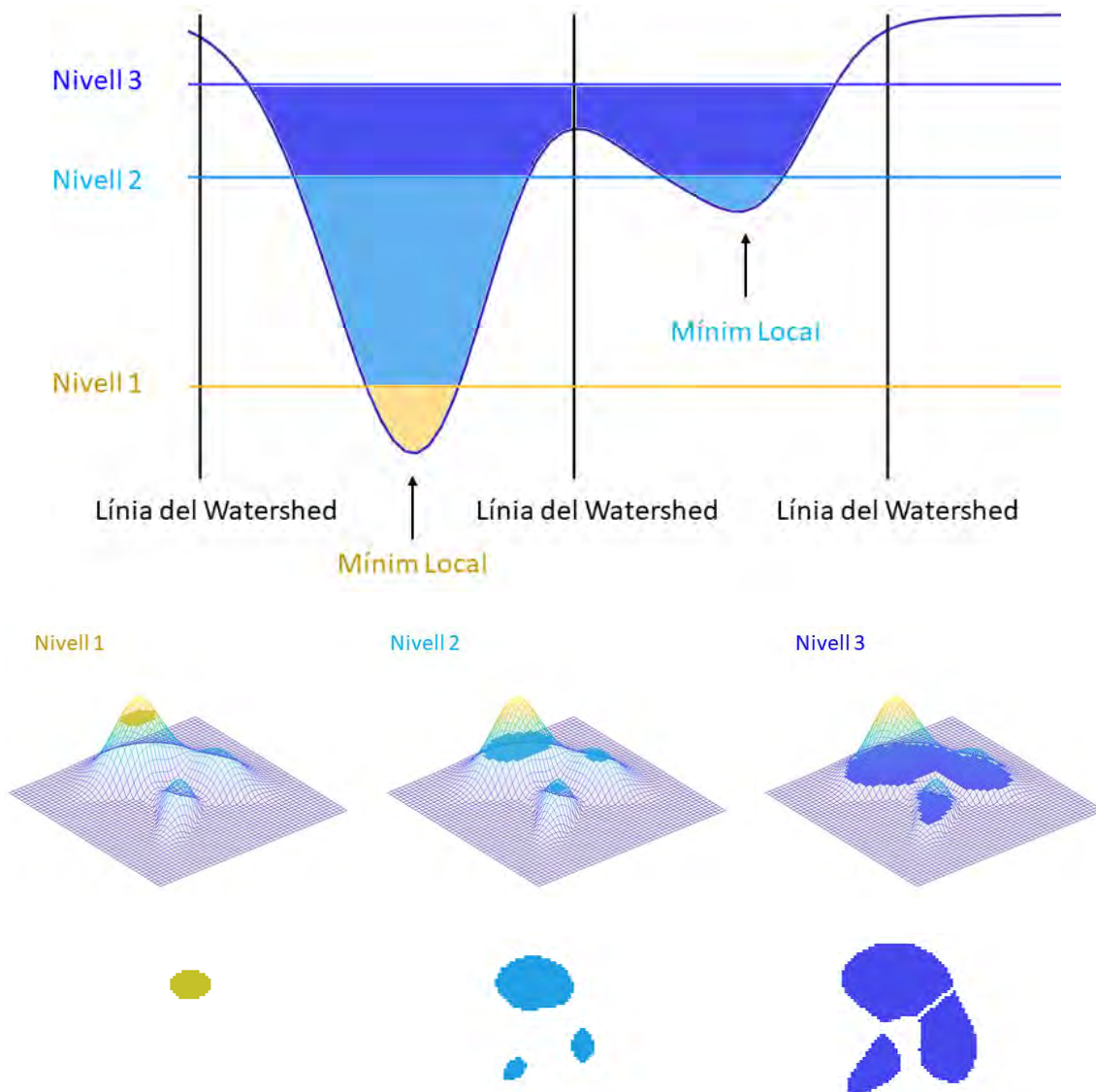


Figura 24. Conques i límits del *watershed*.

Hi ha diversos algoritmes per utilitzar el *watershed*, uns exemples serien:

- **Algoritme d'inundació de Meyer's** [80]: realitza inundacions a partir d'un valor mínim d'intensitat de píxel, els compara amb els píxels veïns i assigna una etiqueta, els píxels que es mostren més diferents respecte al mínim no seran etiquetats i per tant seran els contorns.
- **Algoritme d'expansió òptima del bosc (*Optimal spanning forest o watershed cuts*)** [81] Estableix la consistència d'aquestes conques, unes com a conques de captació i altres com a línies divisòries que les separa. Després, a través d'un algoritme d'equivalència per a realitzar la seva divisió òptima en termes de *minimum spanning trees* [82]. Posteriorment s'introdueix un algoritme de temps lineal per calcular aquests arbres. Aquest algoritme és el més eficient que existeix, tant en la teoria com en la pràctica.

A part de dividir conques també existeixen aplicacions per trobar els màxims relatius d'una imatge, que a diferència dels lindars són menys restrictius [83]. Uns dels algoritmes per a trobar màxims és el màxims regionals (*regional màxima*) que busca regions de píxels connectats per un valor d'intensitat màxima relativa constant,  $I$ , i que els píxels del voltant tots tindran un valor menor que  $I$ , per tant assumirà que aquests píxels connectats són un màxim.

#### 1.7.4 Mètodes d'agrupament

Un algorisme d'agrupament (en anglès, *clustering*) és un procediment d'agrupació d'una sèrie de dades donat un criteri. Aquests criteris generalment són la distància o la similitud entre les dades. La proximitat es defineix en termes d'una determinada funció de distància, com l'euclidiana, encara que existeixen altres més robustes o que permeten estendre's a variables discretes. La mesura més utilitzada per mesurar la similitud entre els casos és la matriu de correlació entre els casos. No obstant això, també hi ha molts algoritmes que es basen en la maximització d'una propietat estadística anomenada versemblança.

Generalment, els vectors d'un mateix grup (o *clústers*) comparteixen propietats comunes. El coneixement dels grups permet una descripció sintètica d'un conjunt de dades multidimensional complex. Aquesta descripció sintètica s'aconsegueix substituint la descripció de tots els elements d'un grup per la d'un representant característic del mateix.

En l'actualitat existeixen múltiples mètodes de *clustering* o agrupament, però en aquest apartat es mostraran els que són més rellevants pel processament d'imatges:

- Agrupament jeràrquic (*Hierarchical*), es dona especial èmfasi a aquest perquè ha estat el més utilitzat en aquesta tesis
- Agrupament k-means
- Agrupament per gaussian mixture models (GMM)
- Agrupament espectral (*Spectral*)

## Agrupament jeràrquic

Es tracta d'un mètode d'anàlisi que busca construir una jerarquia entre els grups. Pot ser amb agrupament ascendent, de petits grups se'n fa un de gros, o descendent, del grup gros en surten subdivisions. Els resultats de l'agrupament jeràrquic normalment són representats per un dendrograma (Fig. 25). Per discernir entre un grup o un altre s'utilitza una mesura de dissimilitud entre conjunts d'observacions, generalment sol ser una mètrica de distància entre les observacions, com ara la distància euclidiana. Un cop realitzades les mesures s'estableix un criteri per diferenciar els subgrups del dendrograma, com ara un llindar de distància. Aquest agrupament pot utilitzar-se per separar grups de dades o bé per segmentar imatges [84].

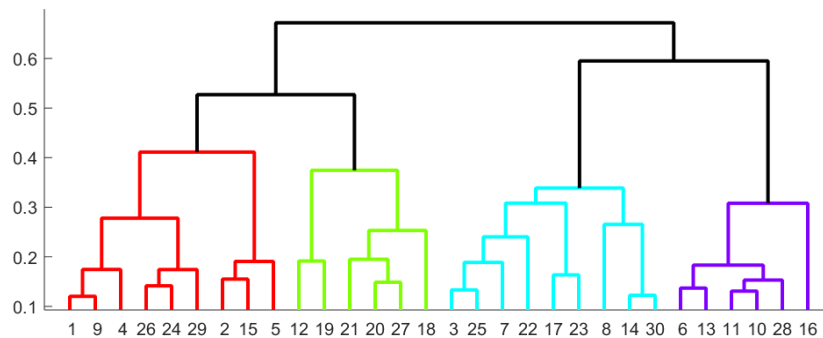


Figura 25. Exemple de dendrograma amb els agrupaments marcats amb diferents colors.

### 1.7.5 Programari

A l'hora de realitzar l'anàlisi d'imatges es disposa de múltiples opcions [85], algunes d'elles estan més enfocades a facilitar la labor als biòlegs o metges menys experts en programació, i algunes altres més encarades al desenvolupament de tècniques i codi. Dintre de les opcions de més alt nivell, les quals no requereixen de coneixements de programació, s'hi troben ImageJ[86], CellProfiler[87], [88], BioImageXD[89], Icy[90] entre altres. Un pas més enllà serien les llibreries de funcions bàsiques de processament d'imatges que poden ser cridades des del codi, com ara ITK[91], openCV[92] i matplotlib [93]. Aquestes eines de processament d'imatges estan constantment en subjecte de revisió, ja que generalment són molt específiques per a cada tipologia d'imatge i a vegades no són aplicables en diferents contextos, sense haver-hi en l'actualitat un estàndard acceptat.

## 1.8 ESTAT DE L'ART

---

En aquest apartat s'esmentarà el punt en el que es situa el marc actual respecte a l'aplicació dels mètodes exposats en l'estudi dels cardiomiòcits i la seva corresponent activitat de calci intercel·lular.

Es dividiran en dos subapartats segons la naturalesa de les imatges:

- Detecció i caracterització d'estructures: es refereix a imatges estàtiques on el que el vol observar es la distribució de les proteïnes o estructures cel·lulars.
- Detecció i caracterització d'esdeveniments: en el marc de la detecció de esdeveniments de la dinàmica del calci i, per tant, en imatges que transcorren al llarg del temps.

### 1.8.1 Detecció i caracterització d'estructures

En els darrers anys hi ha hagut un increment molt gran en la cerca de nous mètodes per a augmentar de la resolució espacial de les imatges, a vegades a costa de treballar amb teixit no viu, fixar-lo en un estat concret. Els estudis més punters aprofiten les tècniques de microscopia en combinació amb tècniques de software per millorar la qualitat dels resultats. Cal afegir que, des d'un punt de vista econòmic, és preferible augmentar la resolució mitjançant tècniques de software ja que la maquinària d'aquestes aplicacions sol tenir un cost molt elevat i per tant que no es troba disponible en tots els centres de recerca.

Començant la revisió dels estudis publicats de menys a més recent, es troba l'article de 2013 de Joseph Wong i els seus col·laboradors [56] es va utilitzar un microscopi electrònic de transmissió, aquest permet obtenir resolucions per sota del les obtingudes amb microscopis òptics que es situa en 30 nm, van utilitzar dues tècniques diferents la tomografia 3D i l'escanejat "block-face", amb les dues es van situar en <10 nm. Aquestes tècniques són molt eficients a l'hora de visualitzar subestructures però la preparació de les mostres ha de ser molt curiosa ja que la fondària no pot ser superior a 100 nm. A més que el teixit ha d'estar fixat i per tant no es pot realitzar *in vivo*. El treball mostra la colocalització dels RyRs amb el calveolate (CAV3) en alta resolució espacial.

En un altre article del mateix any Soeller i Baddeley [94] van observar els RyRs amb un microscopi dSTORM (*direct stochastic optical reconstruction*) que es tracta d'una de les tècniques estocàstiques que aïllen els emissors de fluorescència i els localitzen en la imatge amb la *Point spread function* (PSF). Aquesta tècnica també requereix una preparació especialment prima de la mostra i, en aquest cas, van poder diferenciar estructures per sota dels 30 nm, permetent l'estudi de l'estructura dels RyRs dins la cèl·lula.

Altres estudis més avançats proposen nous mètodes per corregir problemes amb la superresolució, com és el cas de l'article de Heibisch i els seus col·laboradors de 2017 [95] on proposen una correcció

en la deriva de color de la microscopia STED, millorant la resolució espacial de les imatges obtingudes, aproximadament entre uns 40-50 nm.

En un altre treball del mateix any, de Tian i els seus col·laboradors [96] proposen un nou mètode de detecció dels les CRUs a partir dels transients (activitat de calci prolongada) de la cèl·lula estimulada. Recreen el mapa de les localitzacions, per tal d'obtenir una millor resolució realitzen una desconvolució dels llocs inicials d'alliberament de calci, basant-se en processos similars als realitzats en astronomia. L'estudi és complementat amb una comparació de cèl·lules de control i cèl·lules tractades amb un fàrmac que promou la fosforilació dels RyRs (ISO). Els resultat mostraven un augment dels llocs d'activació dels RyRs amb el fàrmac. Van aconseguir una resolució temporal de 147 fotogrames/s i una resolució espacial de 215 nm. Posteriorment (2019) Ladd i els seus col·laboradors [97] van presentar la validació del programa de detecció *CaClean* a partir de dades d'un model sintètic de cardiomiòcits.

L'estudi de Peng i els seus col·laboradors de 2016 [33] utilitzant un microscopi d'electrons, va permetre observar els RyRs en el seu estat tancat i obert amb una resolució de 4.4 i 4.2 Å respectivament, a partir d'aquí descriuen i estudien el mecanisme d'obertura d'aquests canals.

Per últim, l'estudi Sheard i els seus col·laboradors de 2019 [98] mostra una nova tipologia de microscopia de superresolució anomenada "*X10 expansion microscopy*". Aquesta utilitza hidrogels expansibles, un tipus de xarxa de polímers que mitjançant reaccions químiques incrementen de les estructures biològiques i per tant les distàncies físiques entre els fluoròfors. Utilitzen aquesta tècnica amb un microscopi "*AiryScan*", el qual té una matriu de detectors que busquen el punt de major correlació amb la PSF, permetent discriminar la difracció. La tècnica l'anomenen "*Enhanced Expansion Microscopy*" EExM, i obtenen una resolució de ~15 nm en el pla i ~35 nm axial. Gràcies aquesta nova tècnica són capaços de detectar els llocs de fosforilació en els RyRs, i de confirmar que el fàrmac isopro (ISO) promou l'augment de la fosforilació. També comparen la fosforilació entre cèl·lules control i cèl·lules no sanes, prèviament tractades amb *monocrotaline*, observant que la densitat dels RyRs fosforilats varia però no augmenta la seva quantitat.

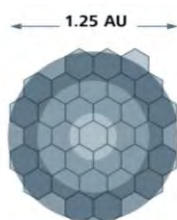


Figura 26. Detector *AiryScan* [99]

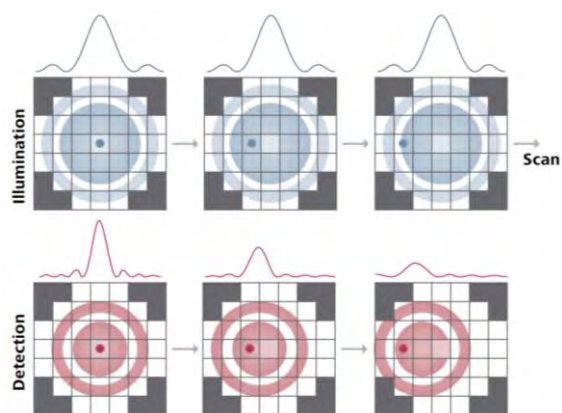


Figura 27. Detecció amb l'*AiryScan* [99].

## 1.8.2 Detecció i caracterització d'esdeveniments

A diferència de la detecció i caracterització d'estructures, l'observació d'esdeveniments de calci en cardiomiòcits no és una disciplina tant popular. Generalment es realitza utilitzant la modalitat d'imatge *linescan*, obtenint elevades resolucions temporals però a costa de perdre informació espacial. Els estudis de caire més fisiològic solen utilitzar programes predissenyats per l'anàlisi d'imatges que es basen en el principi descrit per Cheng i els seus col·laboradors l'any 1999 [73], en el qual proposa la estimació d'un llindar d'intensitat basat en el soroll del nivell de calci basal de la cèl·lula per decidir quins són els candidats a ser esdeveniments. Aquest mètode encara segueix essent utilitzat, com es pot veure en el treball de Zhang i els seus col·laboradors al 2013 [100].

Un dels programes per a detecció d'*sparks* predissenyats que incorpora el mètode proposat mencionat és IDL, que ha estat emprat per un parell d'estudis de Vinogradova i els seus col·laboradors. En el primer estudi, de 2004 es va realitzar la detecció de transients de calci [101], més endavant s'utilitza l'any 2018 per caracteritzar l'obertura espontània basal dels RyRs de cèl·lules sinoauriculars en imatges de *linescan* [45]. En aquest últim treball es realitza una comparativa dels transients entre cèl·lules control i cèl·lules tractades amb fàrmacs inhibidors de les fosfodiesterases (PDEs), RO i CIL. Un altre exemple de llibreria per processar imatges de *linescan* que també utilitza aquest mètode és la de *SparkMaster* [102] de 2007, que consisteix en una llibreria de ImageJ dissenyada per l'anàlisi imatges amb la qual s'han pogut desenvolupar diversos treballs de caracterització de *sparks*. Entre aquests destaca l'estudi de Carneiro-Júnior i els seus col·laboradors, al 2014, per quantificar com l'exercici atenuava els efectes nocius de la hipertensió [103], o l'estudi de Fisher, al 2016, on s'observava l'efecte del sexe a la fuga de calci i com això podria promoure la gènesi de waves [104]. Tanmateix, existeixen altres llibreries d'ImageJ enfocades en la caracterització d'*sparks* en imatges (x,y) al llarg del temps, o altrament anomenades vídeos. Un exemple seria la de *xySparks* [76], desenvolupada al 2014, on la detecció es realitza en base a un llindar imposat per l'usuari. L'exemple més recent de plataforma enfocada a la detecció de *sparks* en *linescans* és *IOCBIO* [104] posada a la disposició dels usuaris al 2019. Aquesta, a part de realitzar l'anàlisi també permet guardar les dades una base de dades SQL. Totes aquestes llibreries i plataformes per detectar els *sparks* en *linescan* es basen en el mètode proposat per Cheng i els seus col·laboradors l'any 1999 [73]. Per detectar *sparks* en seqüències temporals d'imatges la proposta més recent, la de *xySparks*, és aplicar un llindar subjectiu de l'usuari a les imatges. A part dels programes predissenyats també s'observen estudis amb programari fet a mida, on s'utilitzen els mateixos mètodes, com és ara l'estudi de Ellefsen de 2014 [105] on s'utilitza MATLAB i Python per a caracteritzar els *sparks* en imatges TIRF amb una resolució espacial de 0.33  $\mu\text{m}$  i temporal de 2,38 ms, realitzant una posterior validació amb dades sintètiques. Al 2018 Galice i els seus col·laboradors [106] presenten un estudi on es detecten els RyRs i *sparks* utilitzant pluggins de ImageJ i programari específic en Python. L'última aportació de programari per detecció d'*sparks* és *iSpark* també desenvolupat amb MATLAB per Tian i els seus col·laboradors al 2019 [107], el qual primerament aplica un filtrat al senyal, posteriorment

detecta els esdeveniments amb un lllindar adaptatiu i que els acaba filtrant segons els paràmetres morfològics.

Tot i així, també es troben estudis on s'utilitzen nous mètodes de detecció. Per exemple Kong i els seus col·laboradors, al 2008 [108] van emprar un patró de *spark* per a imatges de *linescan*. Un altre exemple és el de Wegner i els seus col·laboradors de 2006 [75] on es va utilitzar la transformada de *wavelet* per detectar els *sparks*. Aquesta permet detectar esdeveniment que compleixen un cert patró amb la versatilitat de les diferents escales temporals. En canvi en l'estudi de Bary i col·laboradors de 2007 [74], es va utilitzar un lllindar d'intensitat per a detectar els *sparks* en imatges de *linescan*, però posteriorment utilitzen l'algoritme de màxims regionals per a separar els *sparks*.

Resumidament, en l'actualitat hi ha a la disposició dels usuaris una petita varietat de plataformes i llibreries per caracteritzar els *sparks* però no s'ha establert encara una tècnica de referència, ni s'ha qualificat un programa millor comparativament a un anterior. El fet que les imatges de calci puguin tenir una variabilitat elevada (a causa de la concentració de fluoròfors, intensitat dels làsers, variabilitat biològica...). També determina el caràcter subjectiu a l'hora d'inserir paràmetres de filtratge de les deteccions automàtiques. Aquest fet que fa que siguin programes molt fets a mida i, per tant, no aplicables a sets de dades diferents. També s'observa que hi ha molts treballs on es caracteritzen aquests esdeveniments amb la modalitat d'imatges *linescan* i que n'hi ha pocs on s'obtingui la informació espacial (x,y) de les cèl·lules. Per últim, cal remarcar que els mètodes de detecció no han variat massa en l'última dècada, inclús caldria afegir que es segueix utilitzant un dels primers mètodes proposats, cosa que reafirma que hi ha una minoria d'estudis referents a aquest camp.



## 1.9 OBJECTIUS

---

Ens els darrers anys s'ha relacionat l'augment d'aquesta activitat amb la fosforilació dels receptors de rianodina, i aquest augment ha estat associada amb arrítmies cardíques [2][3]–[5], [6], [30], [34]–[36], [8], [12]–[15], que poden causar la mort sobtada de pacients. L'objectiu principal d'aquesta tesi és generar eines que permetin obtenir característiques de les dades experimentals d'activitat espontània de calci intracel·lular i la colocalització d'aquesta amb els receptors de rianodina. Es focalitzarà en observar variacions amb diferents condicions fisiològiques, com ara la fosforilació d'aquests receptors, veure com la variació de l'activitat afecta a la propagació del calci al llarg de la cèl·lula i, per tant, el potencial poder per induir arrítmies o mal funcionament contràctil. Aquestes característiques col·laboraran a obtenir nous perfils clínics i poden esdevenir nous paràmetres pels models dels grups d'investigació especialitzats en generar models matemàtics de la fisiologia cel·lular.

Per assolir l'objectiu principal, les tasques del present estudi es desglossen i organitzen de la següent manera:

Objectius tècnics de desenvolupament d'eines:

1. Preparació de mostres biològiques i obtenció imatges d'activitat de calci.
2. Dissenyar eines que permetin processar les imatges i extreure'n dades fisiològiques:
  - a. Detector de receptors de rianodina.
  - b. Caracterització de la distribució espacial dels RyRs.
  - c. Detector d'esdeveniments d'alliberament de calci en els diferents tipus d'imatge:
    - i. *Line Scan* (x,t)
    - ii. *Frame Scan* (x,y,t)

Objectius enfocats la caracterització de les dades i anàlisi de la fisiologia cel·lular cardíaca:

1. Comparació dels mètodes d'obtenció de les imatges i exposar en quins casos és més adient cada mètode i caracteritzar l'activitat espontània de calci i colocalització dels esdeveniments de calci amb els RyRs.
2. Caracteritzar l'activitat espontània de calci en miòcits de ratolí, miòcits humans sans i amb fibril·lació auricular.
3. Comparar les característiques de l'activitat de calci en miòcits de ratolí amb diferents condicions fisiològiques i alta resolució temporal.

# CAPÍTOL 2

# METODOLOGIA

## 2.1 OBTENCIÓ D'IMATGES

---

Una part essencial del projecte ha estat el registre d'imatge de fluorescència, en aquest cas és tracta de registres de vídeo de petits fragments de cèl·lules ventriculars vives. L'objectiu d'aquestes adquisicions és visualitzar al mateix instant de temps la localització dels canals de receptors de rianodina conjuntament amb l'activitat de calci intracel·lular, concretament ha estat focalitzat en el calci citosòlic. La finalitat d'aquestes imatges és entendre els mecanismes fisiològics de les cèl·lules mitjançant l'extracció de característiques dels diferents esdeveniments.

Per dissenyar el protocol d'obtenció d'imatges es van tenir en compte les condicions que requeria aquest procediment:

1. L'obtenció de cèl·lules i la necessitat de poder observar els canals de RyRs i el calci citosòlic.
2. La resolució necessària per a poder caracteritzar els esdeveniments.
3. Les condicions per simular diferents casos fisiològics associats amb la arrítmia.

El disseny experimental i la obtenció de dades han estat realitzades al laboratori del Dr. Leif Hove Madsen situat a l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona a l'Hospital de Sant Pau i la Santa Creu (IIBB - CSIC).

Per elaborar aquest disseny s'ha tingut en compte la literatura on s'ha pogut observar per una banda l'activitat de calci en el citosol de cardiomiòcits [45], [75], [100], [101], [108] i, en altres estudis, la distribució i localització dels RyRs [33], [95], [96], [98], [103].

Aquest projecte ha volgut agrupar aquestes dues tècniques, és per aquest motiu que s'ha escollit utilitzar ratolins modificats genèticament els quals expressen la proteïna GFP en els canals de RyRs elaborats al laboratori del Professor Dr. S.R. Wayne Chen de la Universitat de Calgary [109]. Aquesta modificació permet obtenir imatges de dinàmica del calci de cèl·lules vives i observar simultàniament els canals de RyRs etiquetats amb GFP. Anteriorment per veure aquest canals s'havien de realitzar imatges d'immunofluorescència, per tant fixar les cèl·lules en un estadi concret. Al ser una modificació genètica l'estudi no podrà ser traspassat a cèl·lules humanes, però es podrà comprovar si l'activitat del calci citosòlic segueix uns patrons similars.

### 2.1.1 Preparació de les cèl·lules

L'estudi es centra en estudiar els fenòmens fisiològics a nivell cel·lular, per aquest motiu el procés s'inicia obtenint les cèl·lules del cor de ratolí. Aquest protocol es realitza en acord amb el comitè de protecció dels animals de la institució (Hospital de Sant Pau i la Santa Creu, ICC, IIBB).

1. Injecció d'heparina a l'animal (5000 UI/kg, i.p).
2. Anestèsia amb medetomidine (1mg/kg i ketamine 75 mg/kg).
3. Extracció del cor i canulació de l'aorta.

4. Muntatge del sistema de perfusió Langendorff, amb un flux constant de solució de Tyrode sense calci amb EDTA 0.1M a 3 ml/min a 37°C, durant 3 minuts per netejar la sang residual.
5. Solució enzimàtica durant 8 minuts (col·lagenasa tipus 2, 298 U/mg, 0.4 mg/ml, proteïnasa 0.04 mg/ml i 0.1% albumin).
6. Després de la perfusió el cor, es realitza l'extracció de la cànula i es separa l'aurícula del ventricle.
7. El teixit de la part del cor que es vol utilitzar, en aquest cas el ventricle, es talla en trossets petits de 1 x 1 mm i es segueix amb la digestió enzimàtica durant 5 minuts.
8. Agitació dels fragments de teixit en Tyrode lliure de calci. Aquest procés es repeteix de 3 a 5 cops per tal de dissociar les cèl·lules i obtenir la qualitat òptima dels cardiomiòcits.
9. Les cèl·lules de cada cicle es posen en una solució amb de calci extracel·lular, la concentració d'aquesta solució s'incrementa poc a poc, 0.2, 0.4 i 0.8 mM.
10. Els miòcits es mantenen a temperatura ambient i se seleccionen els quals mostren una bona estructura estriada i no mostren signes de contracció per a realitzar les imatges de dinàmica del calci.
11. S'hi afegeixen els fluoròfors, Rhod-2 (5  $\mu$ M durant 40 minuts) i es renten amb Strips Mice duant 30 minuts.
12. Finalment estaran llestes per observades amb el microscopi confocal, el qual serà un del model Leica SP5 TSC.



Figura 28. Diagrama del procés d'aïllament de les cèl·lules

## Solucions experimentals

Taula 6. Composició de les solucions experimentals

SOLUCIÓ	COMPOSICIÓ
Tyrode lliure de Ca <sup>2+</sup> per aïllament de les cèl·lules (Ratolí i Humà)	88 mM Sucrose, 88 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0.3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1.1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM HEPES, 20 mM Taurine, 10 mM Glucose, 5 mM Na-Pyruvate. El pH s'ajusta a 7.40 amb NaOH 1N a temperatura ambient.
Solució fisiològica externa per imatges de dinàmica del calci per Ratolí	132 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.33 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose. El pH s'ajusta a 7.40 amb NaOH 1N a temperatura ambient.
Solució fisiològica externa per imatges de dinàmica del calci per Humà	132 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.33 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 1.6 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM HEPES, 5 mM Glucose, 5 mM Na-Pyruvate. El pH s'ajusta a 7.40 amb NaOH 1N a temperatura ambient.

## 2.1.2 Fluoròfors

L'objectiu principal d'aquest estudi és relacionar els canals de calci de RyRs amb l'activitat del calci citosòlic. Per aquest motiu, s'ha optat per utilitzar fluoròfors que s'excitin i emetin en dues longituds d'ona diferents: un que ve donat per la modificació intrínseca dels ratolins, el GFP, i un altre que s'ha escollit procurant evitar el solapament d'espectres, en aquest cas és el Rhod2.

El GFP s'excita amb un làser de gas ionitzat d'argó que, dintre el rang de longituds d'ona que pot emetre el làser, es fa ús de l'emissió de 488 nm en l'espectre blau. Un cop excitada aquesta proteïna emet en l'espectre verd, amb el pic a rondar els 510 nm (Fig. 30). Els fotons emesos es recolliran amb el microscopi mitjançant un detector fotomultiplicador (PMT). Donat que l'espectre verd ja està cobert sense opció de modificació, s'ha utilitzat un segon fluoròfor per a visualitzar el calci citosòlic [60] amb espectre d'emissió situat en la franja vermella de freqüències.

Finalment es va escollir l'indicador de calci Rhod2 [61], ja que té el pic d'excitació més proper al pic del làser de l'espectre verd, aquest es tracta d'un làser de gas d'Heli Neó (HeNe) que emet amb una longitud d'ona de 543 nm. El punt màxim d'excitació del Rhod2 està situat en 549 nm i el seu punt màxim d'emissió es troba situat en la longitud d'ona de 578 nm (Fig. 30).

Per evitar la difonia (*crossalking*) del canal verd en el canal vermell, es va desplaçar lleugerament el rang de longituds d'ones que es recull en l'espectre taronja-vermell. D'aquesta manera no es recull en la longitud d'ona del pic d'emissió del fluoròfor però, tot i així, es recull gran part de l'emissió, permetent observar el calci citosòlic i evitant el *crossalking*. Espectre en el canal vermell va ser registrat amb un detector híbrid (HyD), un tipus de fotomultiplicadors més sensibles. Es tracta d'una combinació entre els PMT clàssics i els detectors de fotodíodes de d'allau (APDs) (Fig. 29), obtenint una menor pèrdua d'electrons i un millor contrast en les imatges, essent els PMTs més limitats en sensibilitat i velocitat de resposta. Per estudiar la dinàmica del calci s'ha escollit el detector HyD del confocal per aprofitar l'avantatge de la velocitat de resposta. Pel canal dels RyRs no és tant prioritari aquesta característica ja que es tracta d'una estructura fixa.

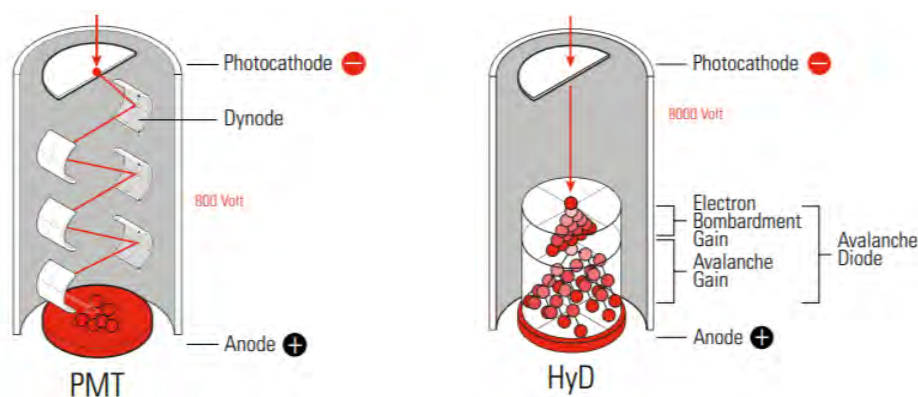


Figura 29. Esquema funcionament PMT i HyD [110]

Selecció dels espectres per evitar el *overlapping/crosstalk* dels fluoròfors:

Taula 7. Espectres d'emissió i excitació dels fluoròfors

FLUORÒFOR	GFP		Rhod-2	
PICS	Excitació	Emissió	Excitació	Emissió
Reals	488 nm	510 nm	549 nm	578 nm
Usats	488 nm	520 - 535 nm	543 nm	620 - 750 nm

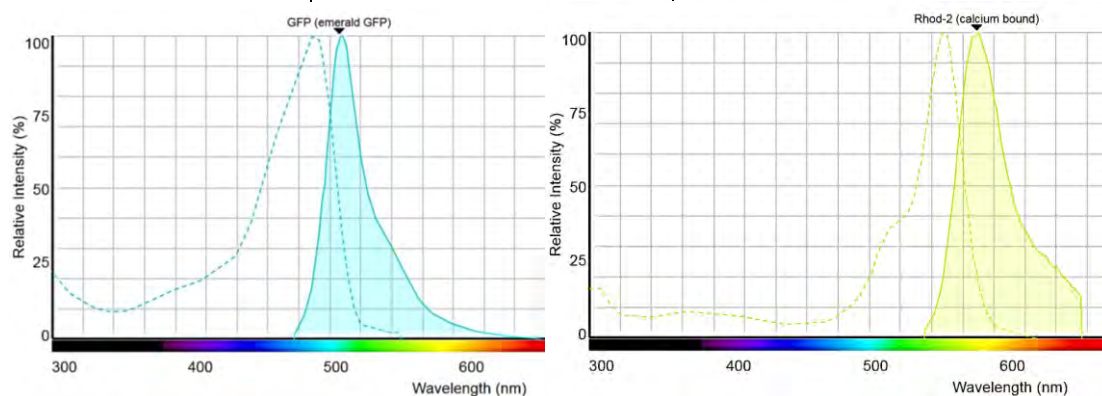


Figura 30. Espectre d'Excitació i Emissió del GFP (esquerra) i del Rhod-2 (dreta) [111]

Per últim la selecció realitzada amb el *software* del microscopi per evitar el *crosstalk*:

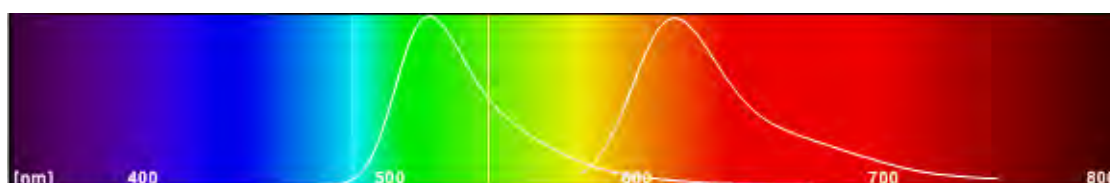


Figura 31. Espectre d'emissió que es recull en cada canal de fluorescència (LAS software).

### 2.1.3 Resolucions i límit de difracció

A l'hora d'observar i caracteritzar els esdeveniments de calci un dels factors importants per plantejar el procediment és tenir en compte quines seran les resolucions, espacial i temporal, òptimes en relació a aquesta dinàmica del calci. Es sabut, segons la literatura precedent a l'estudi [112], [113] que els *sparks* de calci tenen típicament una durada de 20 a 100 ms (Fig. 33). Aquests són els esdeveniments més curts en el temps que es volen observar.

També cal tenir en compte que els conjunts de canals de RyRs es presenten com a unes circumferències amb un radi de 100 nm [4]. El límit de difracció del microscopi confocal és de 300 nm. Aquest límit marca la mida del punt més petit el qual les lents o miralls poden focalitzar la llum, que es veurà en la imatge com un disc d'*Airy* i, depenent del detector, acompanyat pels patrons d'*Airy* o anells concèntrics [114]. Aquest fet és caracteritzat matemàticament per la longitud d'ona de la llum quan il·lumina l'obertura circular de l'objectiu i la mida d'aquesta (Eq. 10). Quan els rajos de llum amb una certa longitud d'ona ( $\lambda$ ) passen a través d'una obertura més petita, aquests començaran a divergir i a interferir els uns amb els altres, afegint espais de llum o cancel·lant-ne d'altres (Fig. 32).

$$dl = \lambda / 2NA \quad (10)$$

$$NA = nr \cdot \sin \theta \quad (11)$$

dl = Límit de difracció      λ = longitud d'ona      NA = obertura numèrica  
nr = índex de refracció      θ = angle convergiu

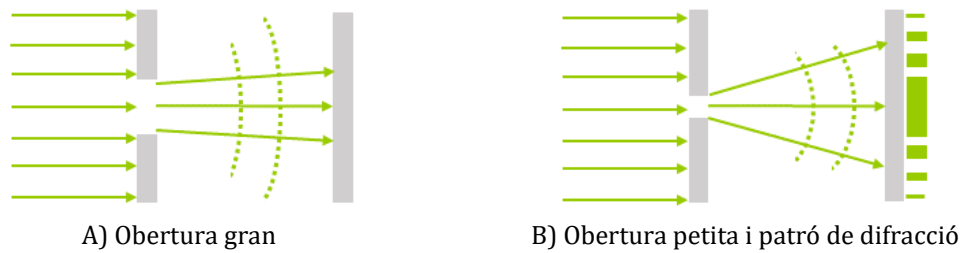


Figura 32. Divergència de la llum segons la seva obertura

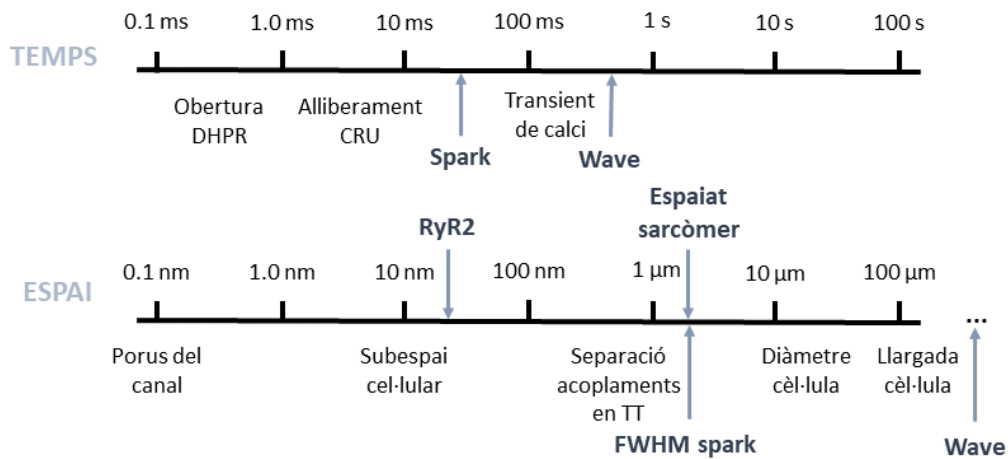


Figura 33. Escales temporals i espacials dels esdeveniments de calci i subestructures [113]

En motiu d'estudiar la dinàmica del calci en relació a la disposició i localització dels RyR2 clústers (RyRs), s'ha prescindit d'obtenir imatges de les cèl·lules senceres per tal de reduir la zona d'escaneig i augmentar la resolució temporal. Per definir la mida del píxel i obtenir els màxims augments s'utilitzarà l'objectiu del microscopi de x63 en glicerol i un zoom del software de 8.

Tenint en compte que els *sparks* tenen una durada mínima de 30 – 50 ms, per poder realitzar una bona caracterització de la morfologia d'aquest necessitem com a mínim quatre fotogrames: el primer per determinar l'estat basal inicial, el segon per visualitzar el pic, el tercer per determinar el decaïment al 50% i l'últim un cop ha retornat a l'estat basal. Per tant, seguint aquesta regla i situant-nos en el pitjor dels casos, és necessària una resolució temporal de mínim: 30 ms/4 punts = 7.5 ms. Quan més petit sigui l'interval de temps entre fotogrames, millors resultats podrem obtenir, també ens serà útil a l'hora de separar quins canals RyRs han estat els iniciadors d'un esdeveniment, en el moment no s'ha pogut quantificar el temps que tarda un RyRs en coactivar a un altre.

La proposta és realitzar una selecció d'una regió que capti tota l'amplada de la cèl·lula i dues *Línies Z* on es disposen els RyRs. Tenint en compte que les cèl·lules mesuren 20  $\mu\text{m}$  de mitjana i les *Línies Z* estan separades per 1.6  $\mu\text{m}$  en els ratolins, es seleccionarà una secció de 20  $\mu\text{m}$  x 4.8  $\mu\text{m}$  com a mínim. Per enquadrar aquesta regió amb la millor relació possible entre resolució temporal/espacial, es selecciona 256 x 40 píxels, aquest número de píxels ens permet tenir una millor resolució temporal però tot i així ens permet visualitzar els RyRs. Prèviament, es van fer proves amb una resolució de 256 x 64 píxels, però en molts casos no permetia diferenciar l'activació dels diferents clústers degut a la falta de resolució temporal.

Finalment, un cop aplicat aquest protocol proposat en els registres s'han obtingut una resolució espacial de 0.12  $\mu\text{m}$  i temporal de 4.16 ms.

Un cop enregistrats els vídeos (*frame scans*) de les regions de les cèl·lules, s'escull en cada un d'ells una *Línies Z* representativa per enregistrar les imatges de *line scan*. Aquestes s'han realitzat per dues resolucions espacials 0.12  $\mu\text{m}$  i 0.06  $\mu\text{m}$ , i resolució temporal 125  $\mu\text{s}$ .

Taula 8. Resum paràmetres emprats en el procés d'obtenció d'imatges amb el microscopi

		Seqüència d'imatges (FS)	Escaneig de línia (LS)
<b>RyRs</b>	Fluoròfor RyRs		GFP
	Làser	Argó 488/500-535 nm (EX/EM)	
	Detector		PMT
<b>Calci</b>	Fluoròfor calci citosòlic		Rhod-2
	Làser	Heli Neó 543/620-750 nm (EX/EM)	
	Detector		HyD
<b>Paràmetres del microscopi</b>	Pinhole		2 AU
	Velocitat d'escaneig		8000 Hz bidireccional
	Objectiu		x63 glycerol
	Potència dels làsers		20 %
	Rang dinàmic		8 bits (256 nivells de gris)
	Offset		0
	Píxels	40 x 256	40 x 256
<b>Resolucions</b>	Resolució espacial	0.12 $\mu\text{m}$	0.12 $\mu\text{m}$ 0.06 $\mu\text{m}$
	Resolució temporal	4.16 ms	125 $\mu\text{s}$ 125 $\mu\text{s}$

#### 2.1.4 Artefactes del microscopi i variabilitat experimental

El microscopi confocal és un aparell molt complex i per tal d'adaptar-se a diferents requeriments de les imatges de fluorescència té un seguit de paràmetres que es poden modificar i variar les propietats de les adquisicions.



Provinents del microscopi:

- Amplificació del fotodetector (*Gain*):  $F_{\text{raw}} = F_{\text{Ca}} \cdot G$
- Atenuació dels làsers: a menys atenuació, menys partícules excitades i menys intensitat
- Offset del microscopi:  $F_{\text{raw}} = F_{\text{Ca}} + \text{offset}$

Provinents del procés experimental o en la fisiologia de les cèl·lules:

- Variació en l'absorció del fluoròfor: si la concentració de fluoròfor en la cèl·lula és inferior, la fluorescència emesa per aquesta també serà menor  $F_{\text{raw}} = F_{\text{Ca}} \cdot [\text{Fluoròfor}]$

Combinació del microscopi i de la biologia cel·lular:

- Nivell basal de calci la cèl·lula ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) i Offset del microscopi:  $F_{\text{raw}} = F_{\text{Ca}} + (\text{Offset} + [\text{Ca}^{2+}])$
- Soroll intrínsec de discretització de valors captats pel fotodetector ( $df$ ) i les fluctuacions de calci ( $[\Delta\text{Ca}]$ ):  $F_{\text{raw}} = F_{\text{Ca}} \cdot [\Delta\text{Ca}] \cdot df$

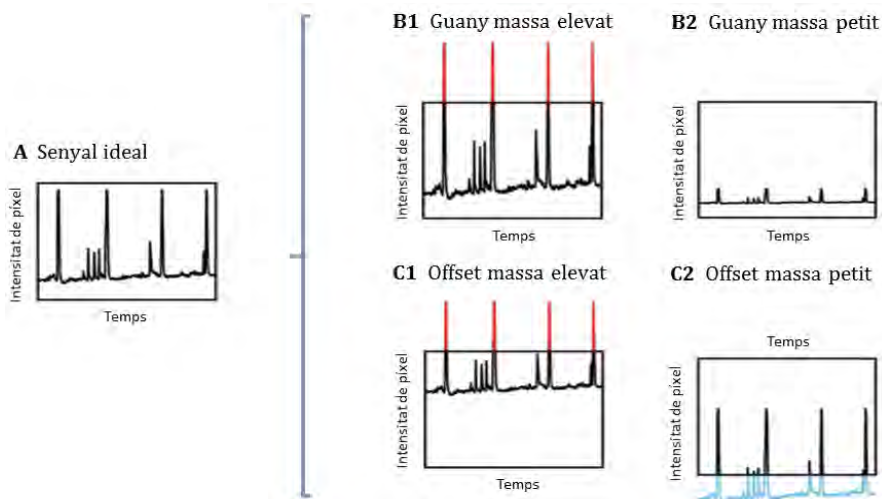


Figura 34. Efectes d'escollir erròniament el Gain i l'Offset del microscopi

#### 2.1.4.1 Proposta per reduir la variabilitat en les dades

Per minimitzar els efectes de la variació de paràmetres del microscopi els experiments han estat realitzats utilitzant sempre els mateixos guanys dels detectors i sense variar l'atenuació dels làsers. També s'ha determinat que l'offset del microscopi fos sempre zero, de tal manera que el color negre que s'observa és equivalent a l'absència d'emissió de fluoròfor o, en aquest cas, a l'absència de calci. Una altra mesura per minimitzar la variabilitat ha estat utilitzar l'indicador de calci Rhod2, que és un dels indicadors de calci més lineals respecte a l'augment de concentració i augment d'emissió.

Per últim, per tal d'evitar la variabilitat del procés experimental, les cèl·lules han estat tractades sempre amb les mateixes concentracions de calci i fluoròfor. També s'ha procurat utilitzar les cèl·lules sanes, que no mostraven un nivell de calci molt elevat, ja que aquest està altament relacionat amb la mort cel·lular. Tot i així, hi ha una variabilitat del calci citosòlic intercel·lular, ja que no totes les cèl·lules absorbeixen la mateixa quantitat de fluoròfor ni comencen des del mateix nivell basal de calci, aquest fet es corregirà un cop obtingudes les imatges amb la normalització.

## 2.1.5 Exportació de les imatges

Usualment, les imatges són obtingudes a partir de microscopis amb els seus propis softwares, que acostumen a ser comercialitzats i amb l'afegit de que utilitzen formats propis, com és ara el ".lif" en el cas de LEICA. Aquests softwares compten amb eines bàsiques d'exploració de les imatges i també amb l'opció d'exportar-les en format imatge o vídeo.

Per tal de poder treballar i explorar les dades sense necessitat de tenir en propietat els programes específics comercials i basant-se en la llibreria de Bio-Formats [115], s'ha desenvolupat una eina que permeti exportar imatges i seqüències de vídeo en imatges en format ".tif" o ".png". També permet exportar un fitxer en format ".xml" altres paràmetres dels procés d'obtenció d'imatges del confocal, com ara les resolucions, al guany dels làser i el temps transcorregut entre fotogrames. A més, l'exportació automàtica permet l'organització i numeració de les carpetes i experiments de manera més consistent, cosa que és important a l'hora d'accedir de forma automàtica a les dades.

L'estructura de les carpetes un cop exportades les dades serà la següent:

> Carpetes codi Ratolí o Pacient

> Carpetes cèl·lules

> Carpetes de series

Paràmetres del confocal .xml

Imatges .tif o .png

## 2.2 DETECCIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS RYRS

El primer pas per poder caracteritzar l'activitat de calci dels miòcits cardíacs és la detecció de les subestructures encarregades de regular l'alliberament de calci en el citosol, els receptors de rianodina 2 (RyRs). Aquests s'observen en l'interior de les cèl·lules com a petites esferes seguint una retícula.

Per realitzar aquesta caracterització s'han utilitzat imatges estàtiques, ja que és una estructura fixa i que, per tant, no es mou espacialment al llarg del temps. En qualsevol cas, seran imatges espacials amb coordenades  $x$  i  $y$ . En el cas de tenir una seqüència d'imatges (o vídeo), s'escolliria la imatge central o d'interès o bé la imatge mitjana de la sèrie. Per tal d'observar les estructures moleculars, aquestes imatges tenen un marcatge específic mitjançant anticossos que donaran fluorescència a les regions d'interès, com ara són els RyRs, els RyRs fosforilats o els canals de calci (tipus L), o bé un marcatge genètic, que es realitza editant el genoma dels ratolins o espècimens. Aquesta modificació provoca que expressin la proteïna GFP en les regions d'interès, en aquest cas en els receptors de rianodina [109].

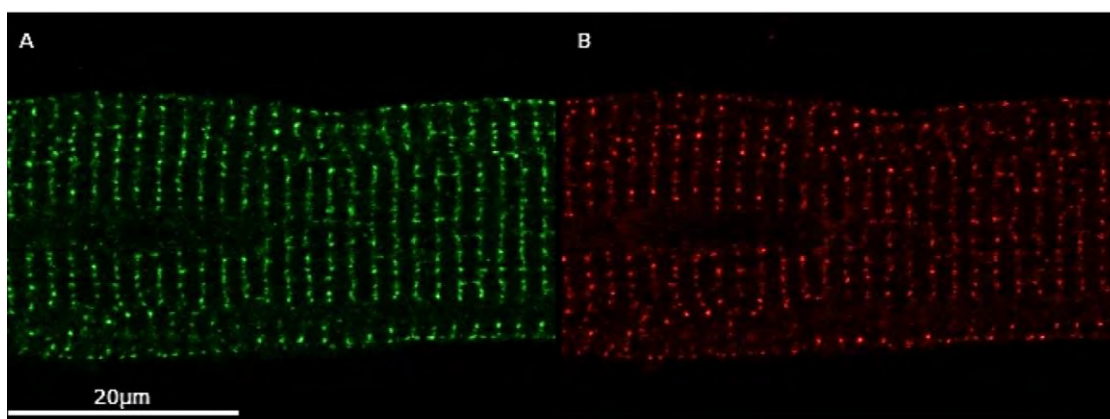


Figura 35. Imatge d'immunofluorescència on s'observen les estructures que es volen detectar. A) Receptors de rianodina. B) Canals de calci.

### 2.2.1 Detecció

Per a totes les imatges se seguirà el següent procés:

1. Estimació de l'estat basal de la imatge (*baseline*  $F_0$ ) utilitzant el quantil inferior (1%) dels valors de l'histograma de la imatge.
2. Normalització seguint la següent fórmula:

$$F_{norm} = \frac{F}{F_0} \quad (12)$$

Essent,  $F$  la fluorescència inicial de la imatge,  $F_0$  l'estat basal i  $F_{norm}$  la fluorescència normalitzada.

3. Convolucionar les imatges per un filtre o patró amb la morfologia que presenten els RyRs per a cada tipus de imatge. En el cas de les imatges de microscopia confocal serà una forma gaussiana de la mida de la *Point Spread Function* del microscopi, 0.2-0.33 µm de radi. Això permetrà ressaltar els RyRs.
4. Aplicació d'un llindar d'intensitat.
5. Segmentació de les illes romanents utilitzant un mètode de *watershed* anomenat "*regional màxima*".
6. Extracció de les característiques rellevants de cada receptor o canal.

Per minimitzar el nombre de falsos positius es realitza un filtratge posterior a la detecció, on els experts podran modificar els paràmetres de filtratge en funció de les característiques detectades.

## 2.2.2 Caracterització dels RyRs

Les característiques més rellevants que extrauen dels clústers són les següents:

- Intensitat i mida de la PSF
- Distribució espacial
- Distància al veí més proper

### 2.2.2.1 Intensitat i mida

Degut a que es treballa amb estructures per sota del límit de resolució òptica els objectes no tenen un contorn clar i es difuminen en el fons. Per tant, s'haurà de definir una regió al voltant dels receptors i estimar les característiques dins d'aquesta.

Per calcular la intensitat de píxel es realitzarà mitjançant paràmetres estadístics, ja que obtenint simplement el màxim podria comportar a guardar un valor referent al soroll i no al valor real, per tant es proposen els següents mètodes:

**Intensitat de fluorescència mitjana** dels píxels dintre d'una ROI al voltant del pic del RyRs

$$I_{mean} = \frac{\sum_{i=0}^n I_i}{n} \quad (13)$$

i: píxels

n: nombre total del píxels en la ROI

I<sub>i</sub>: intensitat de píxel

**Quantil 95% d'intensitat** dels píxels de la mateixa ROI, el quantil permet tenir un resultat més fiable que el valor màxim ja que permet evitar el soroll produït per interferències en les imatges. El quantil 95% divideix la distribució de les dades en el 5% de valors més elevats de la resta 95% de valors d'intensitat més baixos.

$$I_{q95\%} = P(I = 0.95) \quad (14)$$

A l'hora de calcular el **Radi de la PSF clúster de RyRs** com que no és possible saber quin és el contorn real de l'estructura s'ha de definir a partir d'un llindar d'intensitat, ja que la vora del clúster és difusa. Aquest llindar podria ser una fracció del valor màxim de píxel de l'objecte o bé una fracció del valor màxim de píxel de tota la imatge. Tant si s'usa una definició com l'altra pot tenir grans repercussions en el resultat, tot i així tenint en compte que la majoria de receptor s'espera que tinguin una mida similar és més viable la primera per evitar els possibles artefactes del microscopi.

També es pot calcular mitjançant altres definicions, com ara utilitzar la derivada del perfil de l'objecte (línia de píxels que passa pel punt central) i trobar on es troba el punt d'inflexió del decaïment. La millor forma és en comptes de mesurar directament des de la imatge de píxels és mesurar-ho utilitzant un fit d'una funció que es sap que és similar a l'objecte, en aquest cas correspondria a la funció gaussiana. Per fer el mètode més robust i, tenint en compte que els clústers tenen una simetria radial, es calcularà en dos eixos mútuament ortogonals (x i y) que passen pel punt central de la ROI. El radi equival a la mitjana de la  $\sigma$  per a cada eix.

$$g(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2} \quad (15)$$

$g(x)$ : distribució normal univariada       $\mu$ : mitjana de la intensitat dels píxels

$\sigma$ : desviació estàndard dels píxels       $x$ : valors dels píxels en l'eix

### 2.2.2.2 Distribució espacial dels receptors

La principal característica de les cèl·lules cardíques és la distribució reticulada dels receptors, que estan distribuïts en el que anomenem línies Z (*Línies Z*). La retícula segueix l'estructura física contràctil de la cèl·lula, més concretament els punts d'enllaç les molècules d'actina. És per aquest motiu que hi ha un gran interès en caracteritzar aquestes invaginacions i assignar cada receptor a una d'elles. Sabent els centroides dels RyRs definitius es seguirà el següent procés per clusteritzar-los en *Línies Z*:

1. Canvi del domini espacial al domini freqüencial amb la transformada ràpida de Fourier (*Fast Fourier Transform*).
2. Filtratge en l'espectre freqüencial utilitzant un filtre passa banda a partir de les dades de les distàncies de les línies Z de la literatura [25].
3. Extreure característiques espectrals de la imatge, com ara la freqüència representativa de la distància entre *Línies Z* i la freqüència corresponent a la distància entre els receptors veïns.
4. Retornar la imatge al domini espacial.
5. Segmentació de les regions utilitzant un mètode basat en el llindar d'intensitat.
6. Assignar una etiqueta als receptors que no han estat segmentats amb un mètode d'agrupament anomenat *hierarchical clustering*.

El domini espacial a freqüencial també permet obtenir les dues freqüències més repetides en la imatge, que corresponen a la distància entre els receptors veïns de la mateixa Línia Z (DNN) i la distància entre Línies Z (DZL), que és un indicador de si la cèl·lula està sana o si per contra esta una mica contreta.

A part de quantificar la distribució dels receptors en la cèl·lula, es divideix aquesta en anells concèntrics (Fig. 36) per tal d'estudiar les diferents característiques en funció de la distància en la que es troben els RyRs de la membrana. La cèl·lula es divideix en regions de 0.75 µm de forma concèntrica, en cada regió es calcula la densitat de RyRs. La primera regió o capa, més propera a la membrana cel·lular o sarcolemma (SL) representarà els valors que s'observen en la membrana. La segona i tercera regió, representen una zona intermitja (IR). La quarta capa, a una distància de 2.25 µm respecte la membrana, fins a l'interior l'anomenarem el centre de la cèl·lula (CC).

Les característiques segons els anells concèntrics seran:

- La **densitat de clústers** en un anell:

$$\rho_{RyRs} = \frac{\#RyRs \text{ en l'anell}}{\text{Àrea anell}} \quad (16)$$

- La **ràtio de fosforilació**

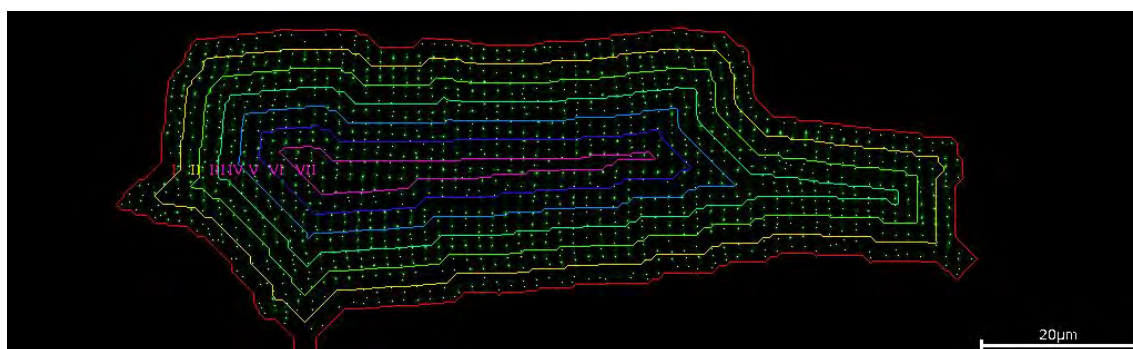


Figura 36. Divisió de la cèl·lula amb anells concèntrics

### 2.2.2.3 Caracterització del grau de fosforilació dels RyRs

La literatura prèvia descriu que la fosforilació de les proteïnes dels receptors afecten a la seva probabilitat d'obertura del canal [32]. Per tal de caracteritzar aquestes alteracions és necessari dissenyar un mètode que ens permeti comparar la intensitat en les imatges amb dos canals de fluorescència: en un dels canals es visualitzen els RyRs totals i en l'altre el grau de fosforilació tenen aquests després de l'aplicació d'un fàrmac.

El mètode proposat es basa en la comparació de les distribucions dels histogrames o funcions de probabilitat d'intensitat en les ROIs de cada receptor i per a cadascun dels canals de fluorescència (verd i vermell). S'obindrà el valor mitjà o màxim de cada receptor en cada canal de fluorescència i es dividirà el valor del canal vermell entre el valor del canal verd, essent aquest resultat la **ràtio de fosforilació**. També pot ser extrapolable a altres condicions fisiològiques que puguin ser mesurades en els receptors i canals de fluorescència diferents.

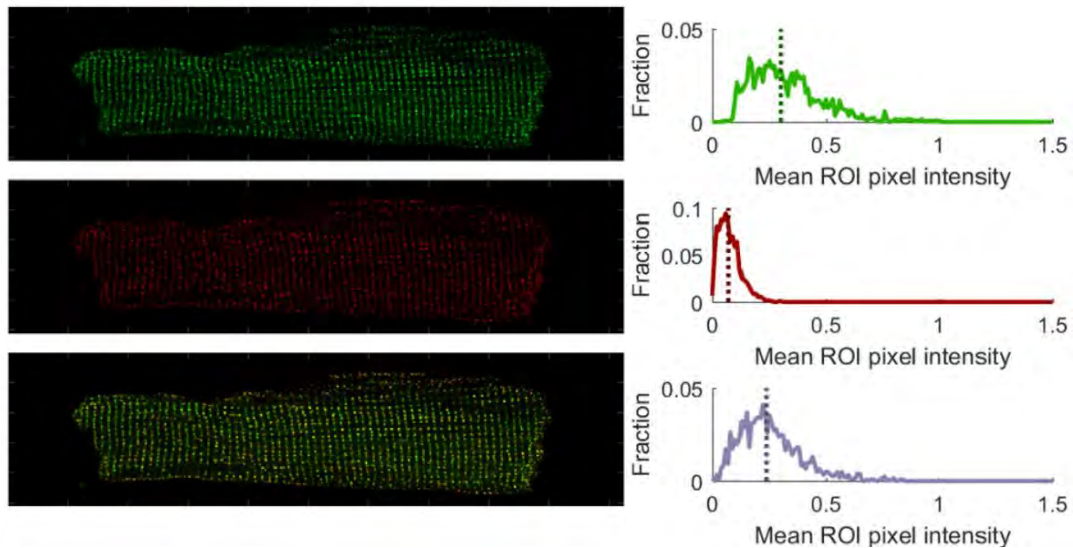
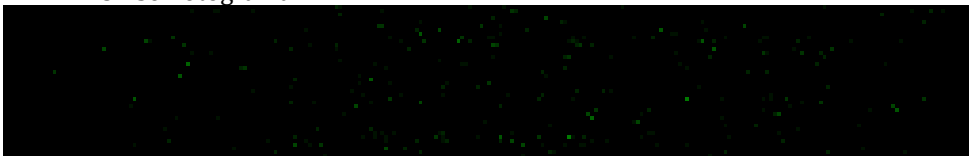


Figura 37. Panell esquerre: Imatges de microscopia confocal de miòcits ventriculars de ratolí. Panell dret: histogrames de cada canal de fluorescència (panells superior i intermig) i la ràtio entre els dos canals (panell inferior).

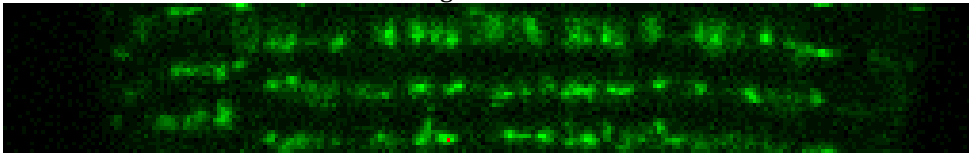
### 2.2.3 Detecció en fotogrames temporals

En les imatges de seqüències de fotogrames és prioritari tenir una bona resolució temporal per poder visualitzar amb claredat els esdeveniments de calci al llarg del temps. Desplaçar el balanç a favor de la resolució temporal comporta un descens de qualitat en la resolució espacial, promovent no es pugui arribar a distingir els canals de RyRs directament. Per aquest motiu es proposa realitzar una acumulació de fotogrames, concretament de 450 ms, per tal d'obtenir una millor imatge per realitzar la detecció dels RyRs. Un cop s'obté una imatge nítida dels RyRs la detecció es realitza seguint el mateix procediment que en les imatges estàtiques, amb la possibilitat de fer una defecció per a petites finestres temporals al llarg del temps per evitar el moviment de la cèl·lula.

#### A Un sol fotograma



#### B Acumulació de 450 ms de fotogrames



#### C Detecció final

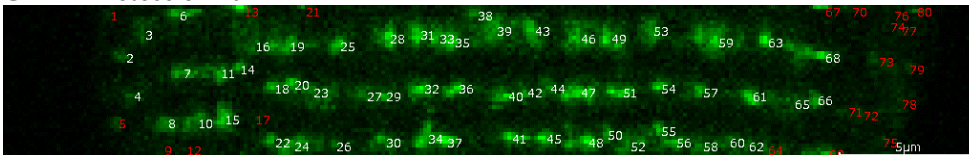


Figura 38. Acumulació de fotogrames per la detecció

## 2.2.4 Validació detecció dels canals

La validació del mètode de detecció de RyRs proposat s'ha dut a terme mitjançant la comparació amb models sintètics de distribució de receptors de rianodina. Aquests models ens permeten saber on està situat un RyRs real i després verificar amb la detecció si és correctament detectat. Per tal de reconstruir al màxim les condicions fisiològiques observades a les imatges de cèl·lules reals, primer caldrà afegir al model sintètic l'efecte de la PSF del confocal. És per aquest motiu que les imatges dels models seran convolucionades per un patró gaussià amb una desviació de  $0.29 \mu\text{m}$ . Aquest paràmetre ha estat calculat d'acord amb el criteri de Rayleigh per estimar la difracció o amplada total del disc d'Airy a mig màxim:

$$r = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA} \quad (17)$$

r: radi  $\lambda$ : longitud d'ona NA: Obertura numèrica

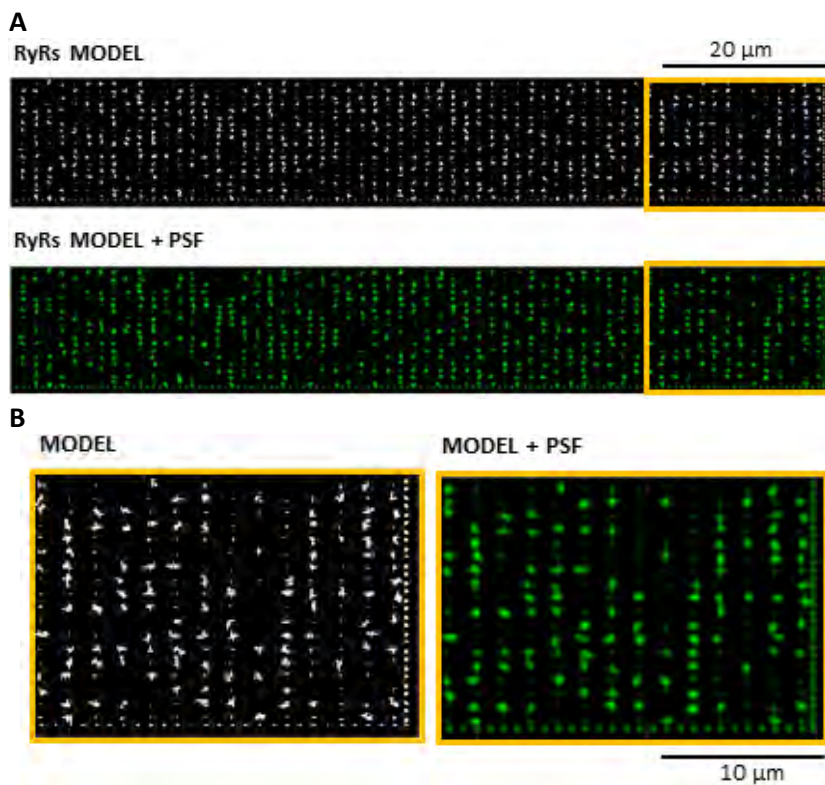


Figura 39. A) Model dels RyRs i model convolucionat per la PSF, B) Zoom de les imatges anteriors

Tenint en compte que dels filtres proposats el llinar més subjectiu i crític és el de la intensitat, per aquest motiu es comprovarà l'efecte d'aquest factor en la detecció de cèl·lules en casos ideals.

Per últim, per tal de simular l'efecte del *baseline* i el soroll del fotodetector, s'afegirà soroll gaussià a les imatges. Generalment el soroll produït pel microscopi confocal és una combinació d'una distribució gaussiana i una exponencial, però s'ha escollit utilitzar el soroll gaussià ja que quasi no es percep la distribució exponencial en les dades [116]. L'efecte del *baseline* s'ha estudiat augmentant la mitjana de la gaussiana i l'efecte del soroll del fotodetector s'ha implementat augmentant la desviació estàndard de la distribució gaussiana del soroll.



El soroll afegit en les imatges es calcularà amb la següent fórmula referent a la ràtio de soroll en la imatge (*Signal to Noise Ratio, SNR* acrònim en anglès):

$$SNR = \frac{P_{senyal}}{P_{soroll}} = \frac{\mu_{senyal}^2}{\sigma_{soroll}^2} \quad (18)$$

$$SNR (dB) = 10 \log_{10} SNR \quad (19)$$

Essent:

$$\mu_{senyal}^2 = \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M \frac{I(x,y)^2}{N \cdot M} \quad (20)$$

$$\sigma_{soroll}^2 = \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M \frac{|I(x,y) - I_{soroll}(x,y)|^2}{N \cdot M} \quad (21)$$

- P: potència
- $\mu$ : mitjana
- $\sigma$ : desviació estàndard
- $I(x,y)$ : imatge original
- $I_{soroll}(x,y)$ : imatge amb soroll afegit
- N: nombre de files
- M: nombre de columnes

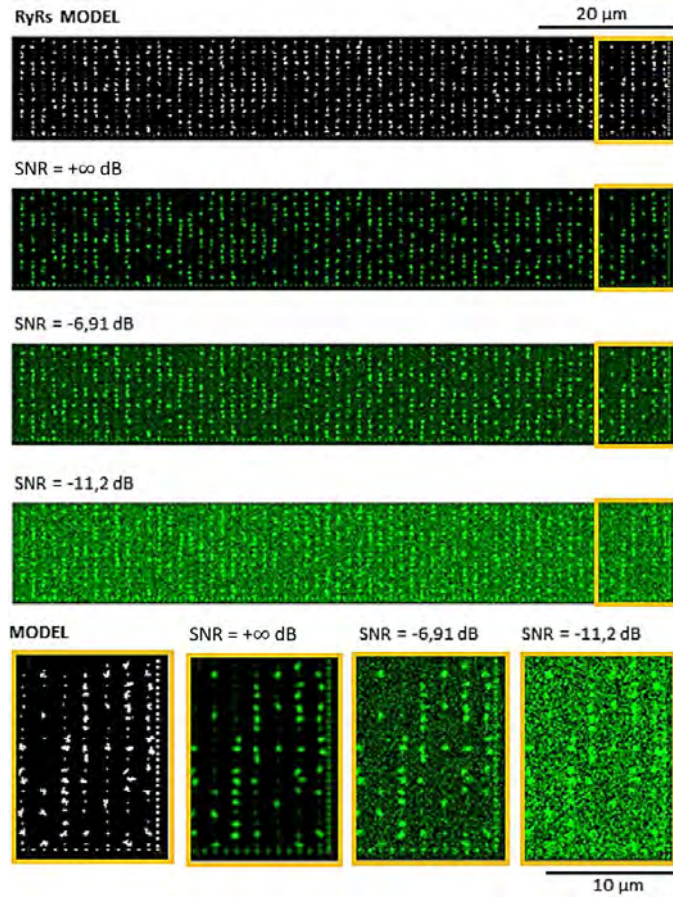


Figura 40. Model de RyRs i addició de soroll en la imatge

### Estimació del soroll en les imatges

Per tal d'estimar el nivell de soroll de les imatges i al no disposar de la imatge real sense soroll el mètode proposat és generar una imatge sintètica dels RyRs convolucionada amb la PSF i comparar-la amb la imatge obtinguda per el confocal.

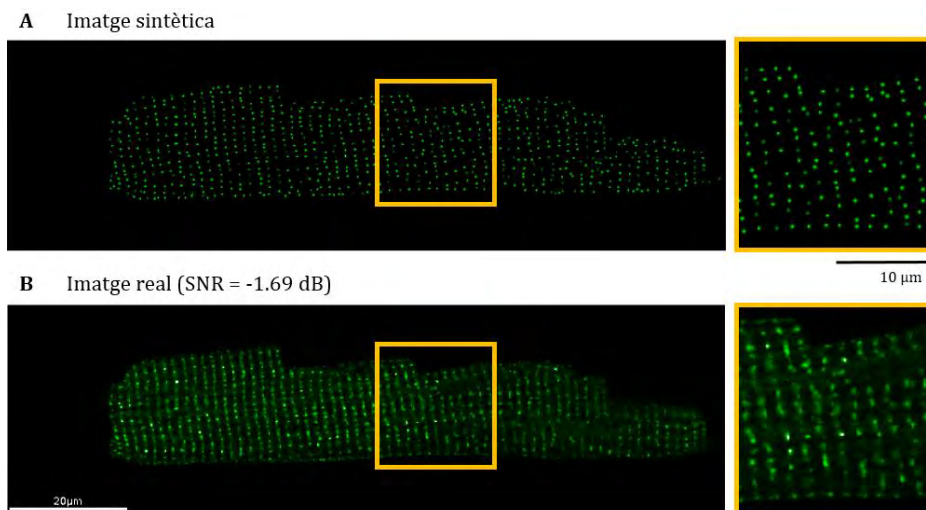


Figura 41. Estimació del soroll en imatges estàtiques

## 2.3 DETECCIÓ I CARACTERITZACIÓ D'ESDEVENIMENTS DE CALCI

L'estudi de la dinàmica del calci respecte la posició dels receptors de rianodina ha generat la necessitat d'implementar un nou procediment per la quantificació d'aquests esdeveniments. El mètode es construeix a partir de la detecció dels receptors de canals de calci. Basar aquesta quantificació en la regió dels RyRs permet simplificar el problema i en comptes de detectar els esdeveniments complerts en els frames 3D  $I(x,y,t)$  de la cèl·lula, que es computacionalment més costós, es realitzarà la detecció dels esdeveniments dels senyals obtinguts de les ROIs basades en els centroides dels RyRs detectats 2D  $s(F,t)$ .

Degut al plantejament d'aquest procés es requereixen imatges dels dos canals de llum de fluorescència, el canal verd per visualitzar les estructures dels receptors (RyR-GFP), i el canal vermell per visualitzar simultàniament l'activitat del calci (Rhod2).

Un avantatge de treballar en base a senyals és la versatilitat del mètode, permetent estudiar *sparks* en altres tipologies d'imatge com ara les d'escaneig de línia (*line scan*).

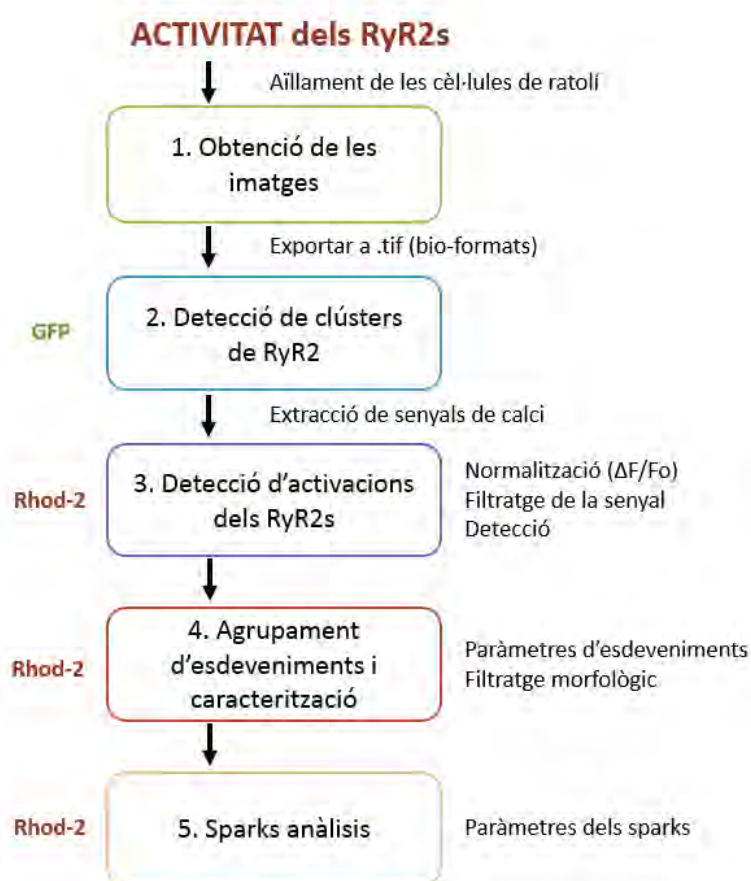


Figura 42. Diagrama de flux del procés

### 2.3.1 Obtenció dels senyals

El primer pas es tracta de detectar els RyRs amb el mètode anteriorment descrit (secció 2.2). Un cop detectats i filtrats, es fixa un centre de gravetat per a cada RyR. En cada un es centra una ROI amb un radi de  $0.25 \mu\text{m}$ . El radi equival a 2 píxels i, per tant, la ROI serà de  $5 \times 5$  píxels.

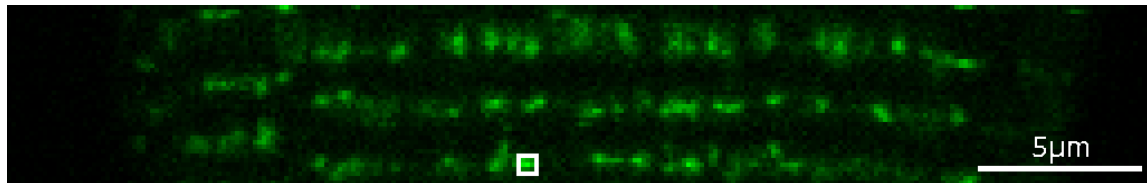


Figura 43. ROI utilitzada per obtenir els senyals centrada en un RyR cluster

Cada punt temporal del senyal representa el valor mitjà dels píxels de l'interior de la ROI per a cada fotograma. Les imatges dels fotogrames no han estat normalitzades prèviament, per tant, el senyal obtingut equivaldrà al nombre de fotons captats pel detector del microscopi confocal.

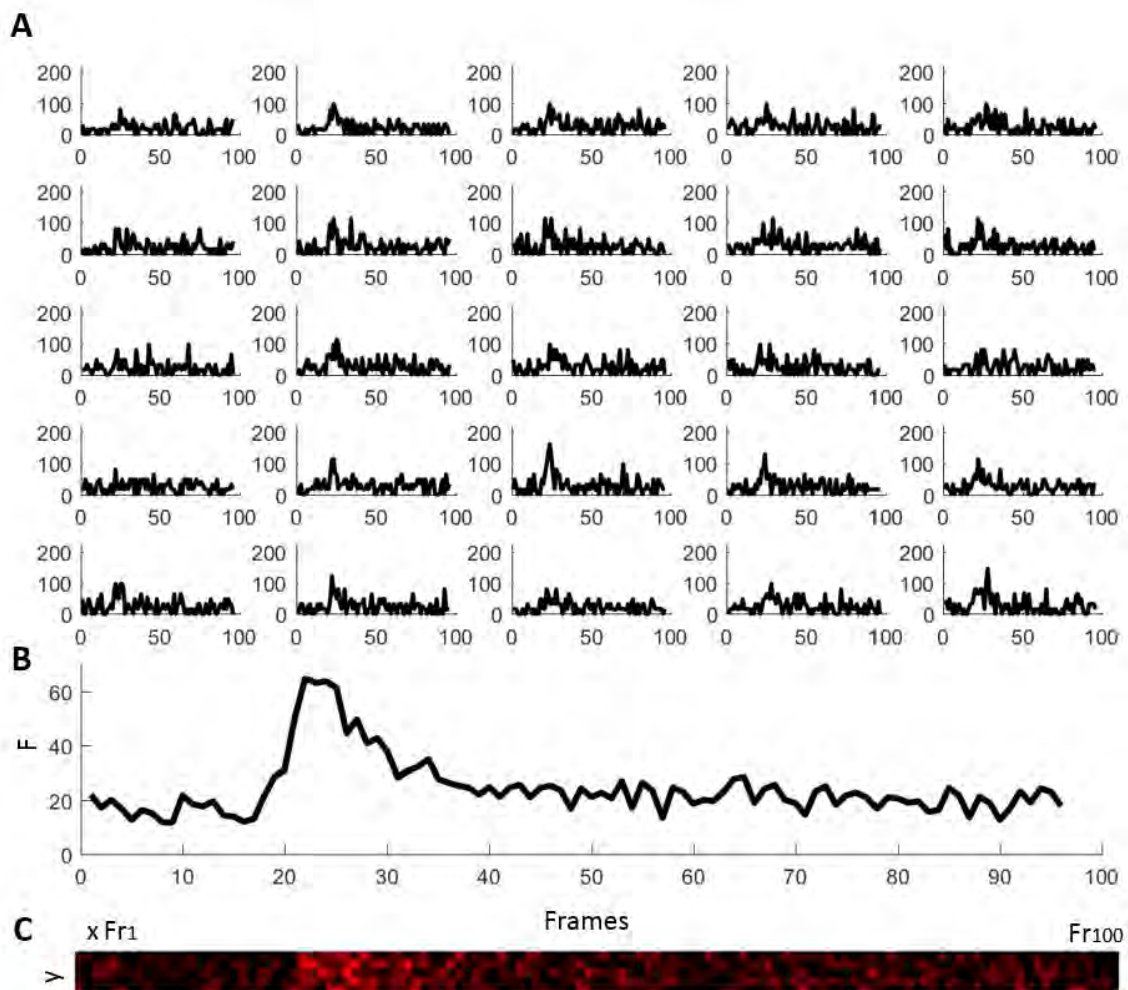


Figura 44. Formació del senyal de calci. A) Senyals crus de cada píxel de la ROI. L'eix y fa referència a la fluorescència del senyal cru i l'eix x mostra l'evolució temporal dels fotogrames o *Frames*. B) Senyal definitiu després de promitjar tots els senyals temporals de cada píxel de la ROI. C) Mostra de l'evolució temporal de la ROI cada 3 fotogrames.

Finalment s'obindrà una matriu amb els senyals obtinguts de cada RyRs seguint la següent nomenclatura:

$$S_{n \times m} = \begin{pmatrix} F_{raw\ 1}(t) \\ \dots \\ F_{raw\ n}(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} t_1\ pRyR_1 & \dots & t_m\ pRyR_1 \\ \dots & \dots & \dots \\ t_1\ pRyR_n & \dots & t_m\ pRyR_n \end{pmatrix} \quad (22)$$

S: matriu dels senyals  
 $F_{raw\ n}(t)$ : senyal temporal de la ROI n  
 $pRyR_n$ : valor mitjà de píxel en la ROI n  
 $t_m$ : fotograma m

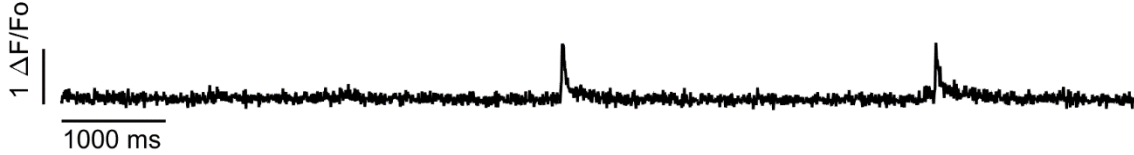


Figura 45. Exemple senyal temporal provinent d'un RyRs durant tot el registre

### 2.3.2 Normalització dels senyals

La normalització es realitza mitjançant la següent fórmula:

$$F_{norm} = \frac{F_{raw} - F_0}{F_{basal}}$$

$F_{norm}$ : Senyal de fluorescència normalitzat

$F_{raw}$ : Senyal cru d'una ROI corresponent a un RyRs clúster

$F_0$ : Valor de l'estat basal del senyal cru (*baseline*)

$F_{basal}$ : Senyal de l'estat basal, sense esdeveniments de calci

El numerador de l'equació ( $F_{raw} - F_0$ ) és l'encarregat de traslladar els senyals de  $F_0$  a zero, mentre que el denominador ( $F_{basal}$ ) s'usa per escalar els senyals a valors similars entre elles, tenint en compte que el nivell basal de la cèl·lula és la quantitat de fluoròfor que ha absorbit, per tant a més concentració de fluoròfor més gran és l'amplitud captada pel microscopi.

S'ha escollit utilitzar la *Median Absolute Deviation* perquè és més robusta a les variacions que poden produir les mostres amb valors atípics.

Per obtenir  $F_0$  es realitza de la següent manera:

1.  $F_{raw}$  és filtrat utilitzant un filtre de mediana d'una finestra temporal de 100 ms, obtenint  $F_{med}$
2.  $F_{raw}$  és filtrat utilitzant un filtre moving Standard deviation amb una finestra temporal també de 100 ms, obtenint  $F_{std}$
3. Finalment:

$$F_0 = \text{mediana}(F_{med} - F_{std}) \quad (23)$$

La correcta obtenció de l'estat basal del senyal no és un pas trivial, ja que un error en aquest pas podria comportar greus canvis en l'amplitud del senyal, i per tant un biaix important en els resultats finals.

Els beneficis que ens proporciona normalitzar els senyals són els següents:

- Permet disminuir la variabilitat de valors de píxel dels diferents experiments, passant de tenir experiments oscil·lant entre valors de [4, 24] i experiments de [40, 100] a tenir experiments amb valors de [0,1]. Gràcies a tenir-les totes escalades iguals després es podrà realitzar una comparació fiable dels esdeveniments.
- Ajuda a suprimir les diferències entre les localitzacions dels RyRs, ja que sovint s'observen regions en les cèl·lules que de per si ja mostren més fluorescència. La normalització ens ajuda a tenir tots els senyals amb un nivell basal similar.

### 2.3.3 Mètode detecció d'esdeveniments

Un cop els senyals han estat normalitzats, es procedeix a realitzar la detecció d'esdeveniments de calci. Aquesta es realitza aplicant la transformada *wavelet* continua ja que millora la qualitat del senyal i reforça la visualització dels esdeveniments respecte al senyal cru de valors de píxel. L'ús de la *wavelet* permet detectar esdeveniments inclús quan hi ha variacions en el *baseline*, cosa que reporta una millora respecte un simple llindar d'intensitat, ja que amb aquest no es podria detectar l'esdeveniment amb claredat en situacions amb *baseline* variable. També permet modificar el suport temporal i, per tant, discernir entre els diferents tipus d'esdeveniments segons la seva durada. En aquest cas, s'usa un suport temporal concret en funció del tipus d'activitat que es vulgui detectar, en cas dels *sparks* serà de 100 ms, en canvi en el cas de les *waves* serà de 1000 ms. Per a seleccionar els candidats a esdeveniments de calci s'aplica un llindar en la transformada *wavelet*, els esdeveniments que superin aquest llindar en cada escala temporal seran els que posteriorment s'analitzaran.

**A** Escala wavelet amb suport temporal d'acord amb els *sparks*



**B** Escala wavelet amb suport temporal d'acord amb els events de propagació

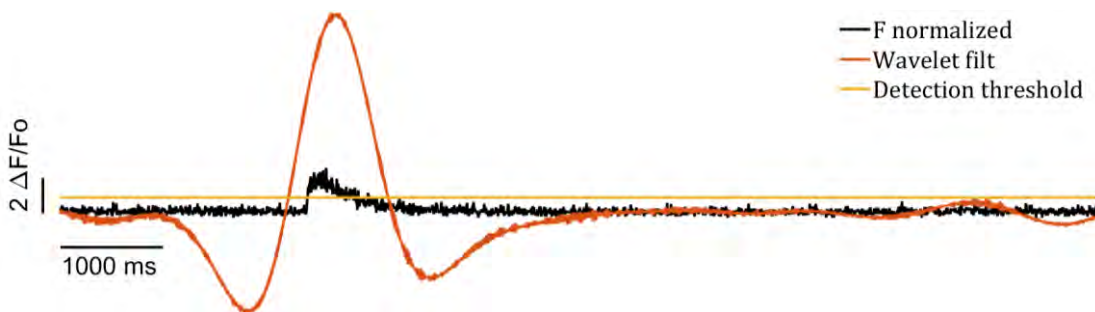


Figura 46. Diferents escales de detecció de la CWT

### 2.3.4 Quantificació dels paràmetres

Per tal de caracteritzar les activacions dels RyRs s'han establert els paràmetres morfològics més significatius de la dinàmica dels esdeveniments de calci:

Paràmetre	Descripció	Fórmula i unitats
<i>Base line (bl)</i>	Estat basal del senyal abans de que es produeixi l'esdeveniment	$F_0$ (F)
<i>Amplitude (amp)</i>	Diferència entre bl i punt màxim de l'esdeveniment	$\Delta F = F_{\text{peak}} - F_0$ (F)
<i>Time to peak (t2p)</i>	Temps des de l'inici de l'esdeveniment fins al pic d'aquest	$t_{2p} = t_{\text{pic}} - t_{\text{bl}}$ (ms)
<i>Rate of Rise (RoR)</i>	Velocitat de pujada de l' <i>spark</i>	$\text{RoR} = \Delta F / t_{2p}$ (F/ms)
<i>Full duration at half màxim (FDHM)</i>	La diferència de temps entre el punt de la pujada i el punt de baixada del calci quan $\text{amp} = 50\% \cdot \text{amp}$	$\text{FDHM} = t_{\text{amp}50p} - t_{\text{amp}50b}$ (ms)
<i>Decay constant (tau)</i>	Paràmetre denominador en el fit exponencial del decaïment de l'esdeveniment	$I(t) = Ae^{(-\Delta t/\tau)}$ (ms)

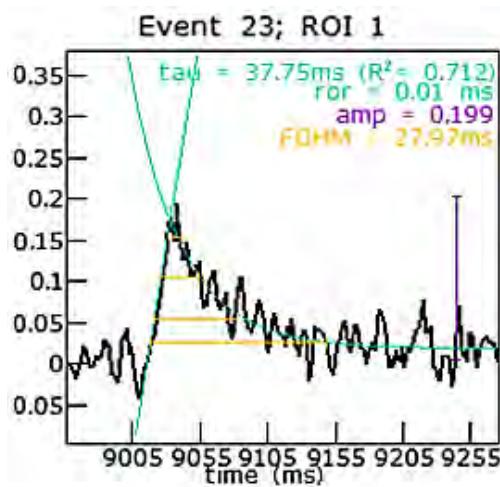


Figura 47. Paràmetres d'una activació

#### Baseline

El baseline, o estat basal de la cèl·lula, és el nivell de fluorescència en repòs. Pot ser mesurat tant global de la cèl·lula per veure si disminueix o augmenta el al llarg de l'experiment, o bé mirar el *baseline* local, com és el cas dels *sparks*. En aquest cas es mira amb una finestra temporal de 10 ms abans de que es produeixi un esdeveniment. Aquest estat ens permetrà diferir si els *sparks* han estat produïts quan la cèl·lula trobava en estat de repòs o si, per contra, s'han alliberat durant una ona de calci.

#### Amplitude

L'*amplitude* o amplitud correspon al nivell de fluorescència en el punt màxim del senyal (pic,  $t_{\text{peak}}$ ). Aquest paràmetre equival al volum de calci alliberat pel clúster de RyRs. Pot ser mesurada de forma absoluta, tenint en compte que el punt inicial és zero, o bé de manera relativa respecte al *baseline* local de l'esdeveniment o *baseline* global.

- Amplitud absoluta:  $\text{AMP} = F(t_{\text{peak}}) - 0$  (24)

- Amplitud relativa:  $\text{amp} = F(t_{\text{peak}}) - F(t_{\text{pre-event}})$  (25)

En cas de que aquest sigui molt sorollós, el valor del pic,  $t_{pic}$ , es pot inferir amb un fit lineal en el primer tram de l'esdeveniment i una exponencial de decaïment per a l'últim tram, en el punt on coincideixin és el pic del senyal i per tant el punt on es mesurarà l'amplitud. En el cas de que la senyal presenti una SNR acceptable es pot establir el màxim d'aquesta dins d'una finestra temporal equivalent o inferior a la durada de l'esdeveniment.

Aquest paràmetre es mesurarà en unitats de fluorescència, que representa el comptatge de fotons del microscopi. Per ser expressada en volum de calci alliberat s'hauria de realitzar un procés experimental addicional per mesurar la sensibilitat del microscopi i del fluoròfor a la concentració del calci. Es tractaria de mesurar la corba de fluorescència/[calci] des d'un nivell basal igual a zero fins que satura la fluorescència i s'assoleix el nivell màxim de concentració de calci mesurable. D'aquesta manera es podria saber segons un nivell determinat d'intensitat de fluoròfor l'equivalent en concentració de calci en el citosol.

### **Time to peak**

El *Time to peak*, o temps fins arribar al pic, representa la durada de la pujada de l'esdeveniment fins assolir el nivell màxim d'alliberament. Es mesura des del punt on s'eleva el calci respecte el baseline fins al punt on el volum de calci alliberat és més elevat o, altrament dit, el pic de l'esdeveniment. Aquest paràmetre estarà expressat en ms, ja que mesura unitats de temps.

$$t2p = t_{pic} - t_{bl} \quad (26)$$

### **Rate of Rise**

El *Rate of Rise*, o ràtio d'elevació del calci, correspon a la velocitat amb la qual s'eleva el calci, o en aquest cas la fluorescència, respecte el temps transcorregut durant la pujada, des de l'inici de l'esdeveniment fins al pic. Es calcula mitjançant un fit lineal en el qual el pendent d'aquest equivaldrà al RoR. Les unitats d'aquest paràmetre correspondran a  $\Delta F/ms$ .

$$RoR = \Delta F / \Delta t = (F_{pic} - F_{bl}) / t2p \quad (27)$$

### **Full Duration**

La *Full Duration*, o durada de l'esdeveniment, és la diferència de temps per a una certa amplitud del senyal entre un punt de la pujada i el punt de baixada de l'esdeveniment. Generalment, es mesura quan l'esdeveniment ha assolit el 50% de la seva amplitud màxima (FDHM), però també es poden utilitzar altres percentatges com ara: 25%, 75%, 90%... El més comú és el de 50% perquè evita el soroll de l'inici i final de l'esdeveniment, o bé les petites fluctuacions del pic. Els valors són donats en unitat de temps, que en aquest cas seran ms.

$$FDHM = t_{amp50\%f} - t_{amp50\%i} = t2p/2 + t_{50\%d} \quad (28)$$

## Decay constant

La *decay constant*, constant de decaïment o tau, es un paràmetre que s'utilitza per mesurar la baixada del calci, i presenta un comportament molt similar a una funció exponencial. En alguns casos també ha estat modelada com a una doble exponencial, justificant-se en diversos processos involucrats en aquest decaïment com ara la difusió del calci en el citosol, la recopilació de calci al reticle sarcoplasmàtic i l'alliberament d'aquest a través de la membrana del miòcit. El fit més comú és el d'una funció simple exponencial:

$$F(t) = Ae^{-(t-t_0)/\tau} \quad (29)$$

On  $e$  es la base exponencial neutra ( $e = 2.7193..$ ),  $A$  és el factor de normalització,  $t_0$  és el temps inicial i el més important,  $\tau$  (tau), que és la constant de decaïment.

Aquesta constant ens indica la velocitat amb la qual la intensitat del senyal decau independentment del valor actual. És definida com el temps que tarda en decaure la intensitat per un factor de  $e^{-1}$ , 0.368 aproximadament, que és quan la intensitat redueix el seu valor en un 36.8%. S'expressa en unitats de temps (ms), però és important recalcar que aquesta constant no reporta cap valor de mesura de duració temporal ni d'amplitud del senyal, només aporta informació de la rapidesa de la caiguda.

### 2.3.5 Filtratge dels esdeveniments

Un cop mesurats els paràmetres més característics dels esdeveniments de calci o, en aquest cas, activacions de RyRs, es filtraran els que no s'ajustin als paràmetres establerts. Aquest procés es fa per evitar falses deteccions després de la primera selecció de candidats amb la *continuous wavelet transform*, ja que es poden donar casos de detecció de soroll del microscopi com a *spark* o bé detecció d'esdeveniments de propagació. També s'utilitzaran aquest paràmetres per discernir entre difusió del calci o activació real, en aquest cas es pot diferenciar mitjançant el RoR, que per a la difusió serà més lent, i també amb la amplitud, que en el cas de la difusió hauria de ser menor.

Tanmateix, utilitzant una escala temporal més gran de la *wavelet*, similar a la de les ones de calci, permetrà discernir si una activació ha estat donada a dins d'una *wave* o bé es tracta d'un esdeveniment localitzat de calci. Cal especificar que l'estudi es centrarà a detectar només els esdeveniments que no es propaguen al llarg de la cèl·lula, per tant els esdeveniments tipus ones de calci (*waves*) o mini-ones de calci (*mini-waves*) es descartaran.

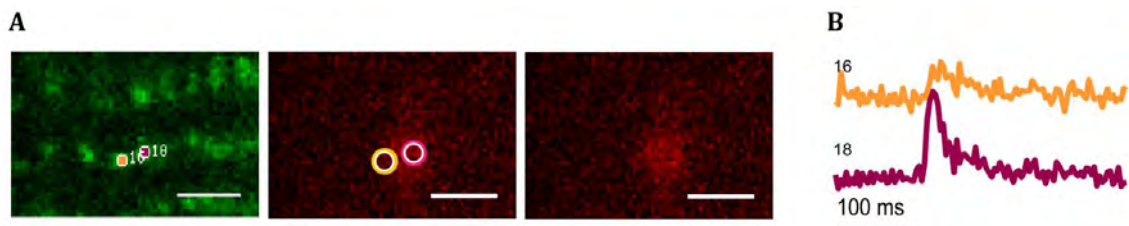


Figura 48. Exemple spark amb difusió. A) Canal RyR-GFP i acumulat de 20 ms de fotogrames en el canal vermell del calci, la llegenda és de 2  $\mu\text{m}$ . B) Senyals provinents dels RyRs marcats, s'observa que l'activació del RyRs nº 16 no és un spark real.



### 2.3.6 Agrupació de les activacions en sparks

A partir de la detecció definitiva d'esdeveniments de calci localitzats, es porta a terme l'agrupament o *clustering* d'esdeveniments provinents de RyRs en esdeveniments més grans, anomenats *sparks*. Es creu que hi ha *sparks* de diferents mides, ja que s'ha vist amb anterioritat que el FWHM varia en diferents condicions. Mitjançant la detecció d'esdeveniments provinents de RyRs i l'agrupació a posteriori permetrà observar el número de RyRs que intervenen en els *sparks*.

Per a realitzar l'agrupament s'ha utilitzat un algoritme d'agrupament jeràrquic, o altrament dit *hierachical clustering*, utilitzant un llinar de distància,  $2 \mu\text{m}$  en el cas de la espacial i 50 ms de la temporal. La distància engloba dues mètriques diferents, i és per aquest motiu que el temps ha estat normalitzat respecte l'espai amb el següent factor.

$$Fact = \frac{dist. espacial}{dist. temporal} = \frac{2 \mu\text{m}}{50 \text{ms}} \quad (30)$$

Un cop obtingut aquest factor es multiplica pels valors temporals dels pics dels *sparks* per tal de que les distàncies temporals siguin proporcionals a les espacials.

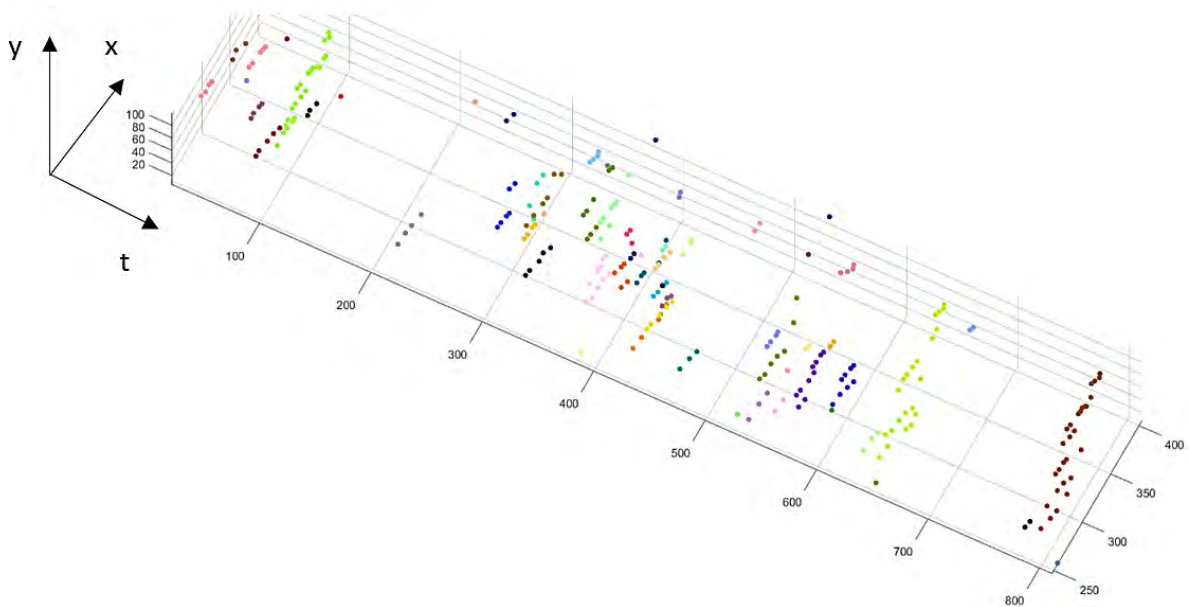


Figura 49. Exemple d'agrupament d'esdeveniments a *sparks*, cada punt és una activació d'un RyRs i el color marca en quin grup s'ha agrupat

### 2.3.7 Quantificació dels paràmetres de sparks

Per a la caracterització dels *sparks* o esdeveniments espontanis de calci localitzats, s'utilitzaran els paràmetres establerts en estudis anteriors: amplitud, *rate of rise*, *time to peak*, *full duration*, la constant de decaïment i el *base line*.

A diferència de les activacions, els senyals per mesurar aquests paràmetres s'han obtingut centrant una ROI de 2  $\mu\text{m}$  de radi, on el centroide serà el punt on es minimitzen les distàncies entre els diferents RyRs que intervenen en aquell *spark* en qüestió.

Deixant de banda els paràmetres anteriors, s'han obtingut noves característiques d'aquests esdeveniments. El fet de que ja no es necessiti la informació localitzada en els RyRs obre les portes a noves possibilitats, i permet realitzar quantificacions a nivell espacial.

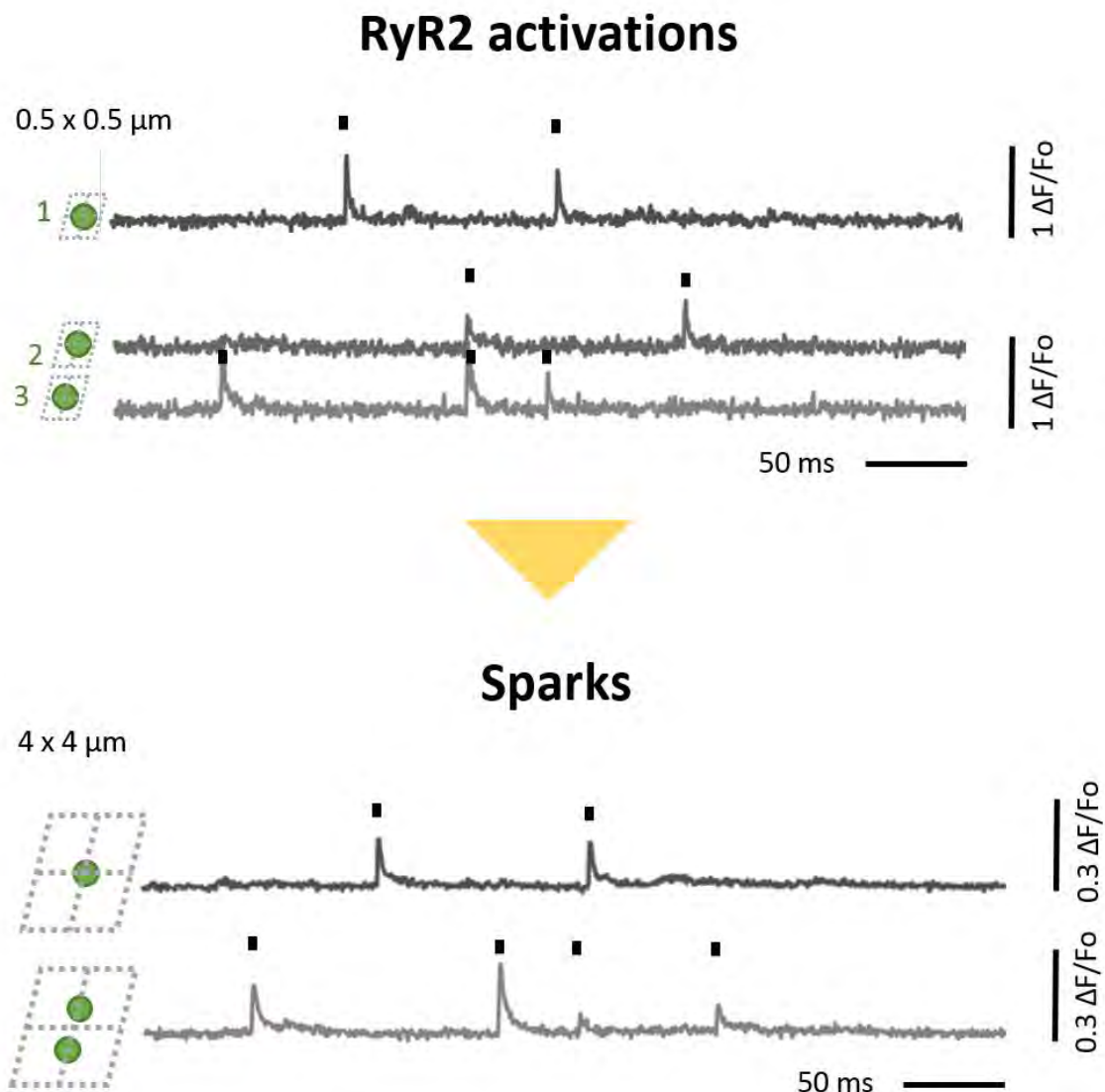


Figura 50. Extracció dels senyals dels *sparks*

## Full Width at Half Maximum

El FWHM, o bé amplada completa de l'*spark* a mitja alçada, ens proporcionarà informació sobre la difusió de l'esdeveniment, i per tant sobre l'extensió d'aquest a través l'espai. Per mesurar-lo s'ha optat per una tècnica similar a la mesura del radi dels RyRs, però en aquest cas es tindran en compte quatre eixos que confluiran en el centre de la ROI i estaran separats amb un angle de 45° entre ells:

- Dos ortogonals vertical i horitzontal, seguint els eixos x i y
- Dos ortogonals que passen per les dues diagonals de la imatge

La imatge utilitzada per a realitzar la mesura es realitzarà amb mateixa mida de la ROI que s'ha utilitzat per realitzar els altres càlculs, 2 µm de radi, i obtindrà la mitjana dels fotogrames en aquesta regió durant de 60 ms, 20 ms abans del pic de l'esdeveniment i 40 ms durant la caiguda.

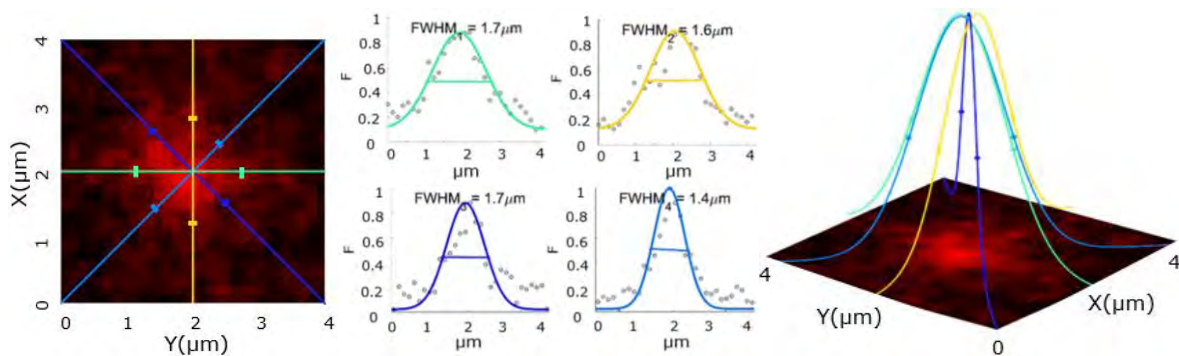


Figura 51. Exemple gràfic del càlcul del FDHM

## Massa del spark

La massa és un paràmetre que reflexa el volum de calci alliberat en el citosol. Es tracta de la integral del senyal de fluorescència des del punt on es comença a elevar el calci fins que retorna a l'estat basal posterior a l'esdeveniment. És un tret morfològic de l'*spark*, o bé de les activacions de RyR2 clústers, que engloba tots els paràmetres morfològics anteriors (amp, RoR, FDHM, tau..) i permet acumular les petites variacions de cadascun d'ells per plasmar-les en conjunt en un sol paràmetre.

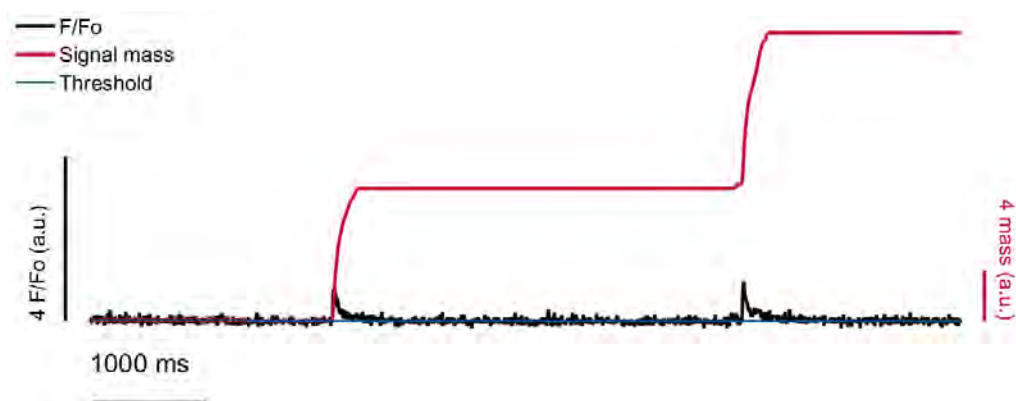


Figura 52. Càlcul de la massa de dos sparks

## Nombre de RyRs

El nombre de RyR2 clústers que participen en un *spark* vindrà donat pel nombre d'activacions que es troben en cada grup d'activacions designat per l'algoritme d'agrupament jeràrquic (*hierarchical clustering*)

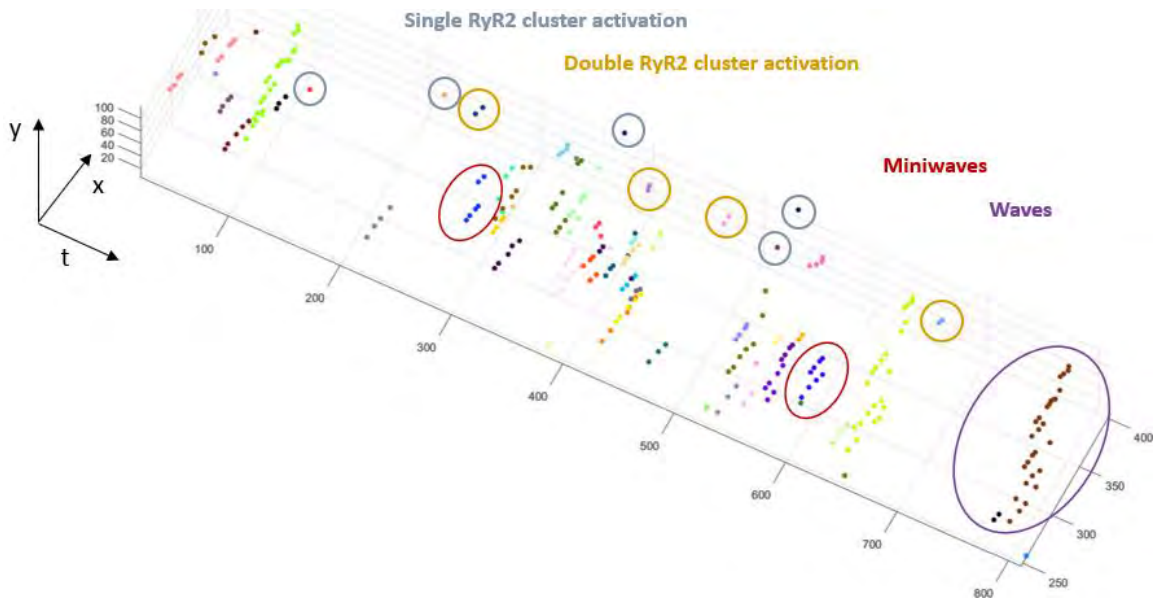


Figura 53. Nombre de RyRs en els esdeveniments

### 2.3.8 Quantificació de paràmetres generals d'activitat

A part dels paràmetres propis dels esdeveniments també els poden obtenir paràmetres generals d'activitat de calci de la cèl·lula. Aquests expliquen d'una forma més global què comporten les petites diferències morfològiques en els *sparks* de forma generalitzada.

Aquest paràmetres seran:

- Freqüències d'esdeveniments: activacions, *sparks*, *waves*...
- Coocurrència
- Ràtio de RyR2 clústers actius
- Trajectòries

### Freqüència d'activacions

Nombre d'activacions que han ocorregut en un clúster de RyRs durant un temps donat en una cèl·lula. El temps serà el temps total en que la cèl·lula ha estat en repòs i no ha tingut cap *wave*, ja que durant aquestes no s'analitza l'activitat espontània de calci.

$$Freq_{act.}(RyR) = \frac{\#activacions}{t-t_{wave}} \quad (31)$$

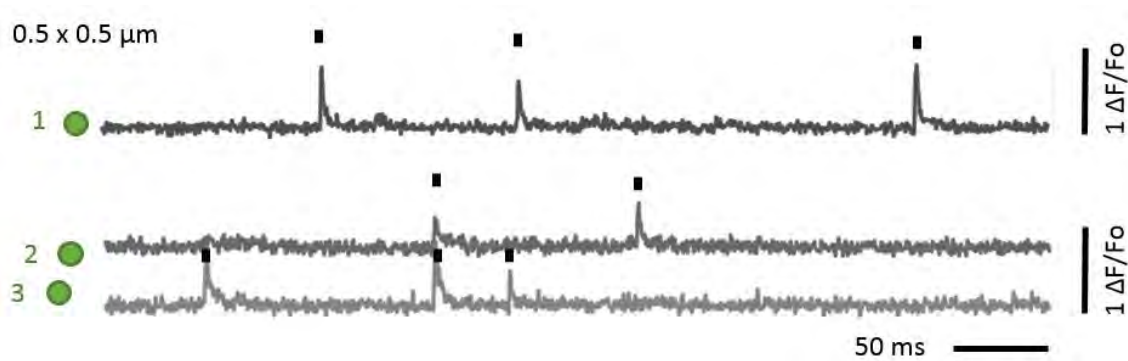


Figura 54. Freqüència d'activacions. L'1 en tindrà una freqüència de 3 acts/10 s, el RyR 2 tindrà 2 act/10 s i per últim el RyR 3 3 acts/10 s.

### Freqüència d'sparks

Es defineix com el nombre d'*sparks* que hi ha en una àrea de cèl·lula durant un temps determinat. Com més gran sigui l'àrea més augmenta la probabilitat d'observació d'*sparks*, per tant no seria correcte compara freqüències sense tenir en compte les àrees d'on s'han mesurat aquestes.

$$Freq_{sparks} = \frac{\#sparks}{(t - t_{wave}) \cdot A_{cèl.lula}} \quad (32)$$

### Freqüència d'activació de ROIs

Un altre paràmetre general d'interès és la freqüència d'activació de les ROIs, o agrupacions de RyRs que s'han activat conjuntament. En cas que un RyR només hagi tingut sparks sense implicació de RyRs veïns, la freqüència de la ROI en qüestió serà igual a la freqüència d'activació del RyR.

$$Freq_{sparks} (ROI) = \frac{\#sparks}{(t - t_{wave}) \cdot A_{cèl.lula}} \quad (33)$$

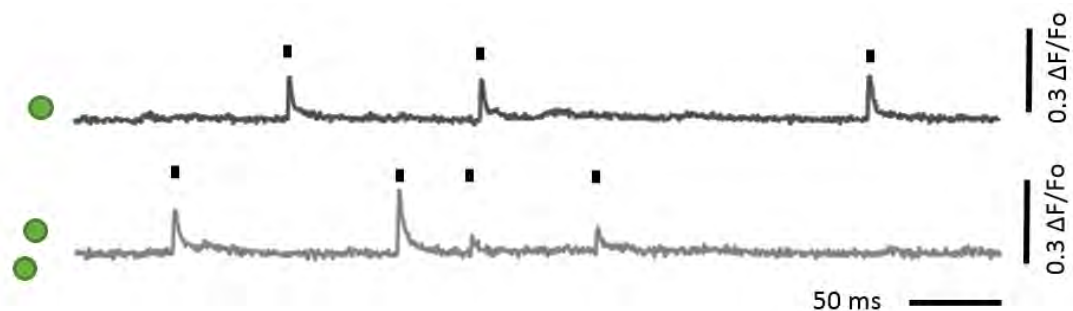


Figura 55. Freqüència d'*sparks*. La ROI superior tindrà una freqüència de 3 *sparks* / 10 s, la ROI inferior tindrà una freqüència de 4 *sparks* / 10 s.

### Freqüència de waves

Nombre de *waves*, o onades de calci, que hi ha hagut en una cèl·lula (àrea) durant un temps de registre determinat.

$$Freq_{waves} (ROI) = \frac{\#waves}{t \cdot A_{cèl.lula}} \quad (34)$$

## Coocurrència

La coocurrència fa referència a la quantificació de la freqüència de grups de RyRs recurrents, aquest paràmetre proporciona informació de punts calents o de major activitat a dins la cèl·lula, i també informació de quins clústers de RyRs es coactiven mútuament i reiteradament. És similar a la freqüència d'activació de les ROIs, però en aquest cas només comptabilitza les activacions conjuntes. Si per exemple, una ROI conté 2 RyRs, només es tindran en compte els *sparks* els quals intervinguin els dos clústers, descartant les activacions de RyR2 clústers simples o úniques.

En la figura 56 es poden observar, marcades en un color diferent, parelles de RyRs coactivats conjuntament. En el panell inferior es visualitzen els senyals d'activació pertinents a cada RyR. En el cas dels RyRs 56 i 58 (taronges), es pot visualitzar que tenen una coocurrència de 2. En canvi els RyRs 20 i 21 (verd llima) només es coactiven un cop, per tant tindran una coocurrència igual a 1.

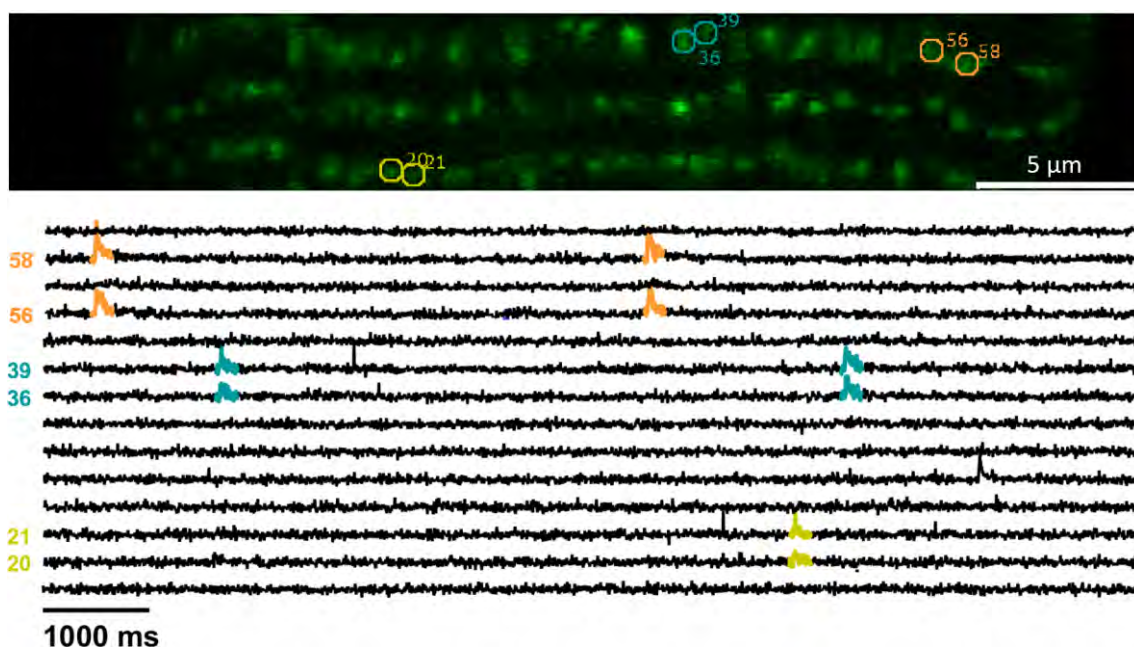


Figura 56. Coocurrència. Parelles de RyRs que tenen sparks múltiples vegades. Panell superior: RyRs i parelles marcades en color. Panell inferior: Senyals de calci corresponents a cada RyR assenyalat, els esdeveniments que es repeteixen estan destacats amb els colors del grup de RyRs corresponent.

## Ràtio de RyRs actius

La ràtio de RyRs actius és el nombre de RyR2 clústers que s'han activat respecte el nombre de RyRs totals de la regió de la cèl·lula. Proporciona una idea de quina àrea de la cèl·lula ha presentat una activitat la qual es podria relacionar amb algun procés fisiològic. Per exemple, una àrea activa més gran pot ser deguda a que hi hagi més RyR2 clústers fosforilats i, per tant, que siguin més sensibles a activar-se.

## Trajectòries

A partir de l'agrupament de l'activitat de calci s'identificaran les trajectòries d'activacions dels RyRs. D'aquestes trajectòries se n'obtidran les distàncies en el temps i l'espai. També es podrà obtenir informació de la direcció de propagació de l'esdeveniment, si s'ha propagat en la mateixa línia Z o si ha saltat a una línia Z del veïna. Aquestes direccions són importants ja que la propagació d'un esdeveniment dintre de la mateixa línia Z no comporta un risc tant important la propagació a la *Línia Z* veïna ja que, en aquest cas, es podria activar la maquinària contràctil de la cèl·lula.

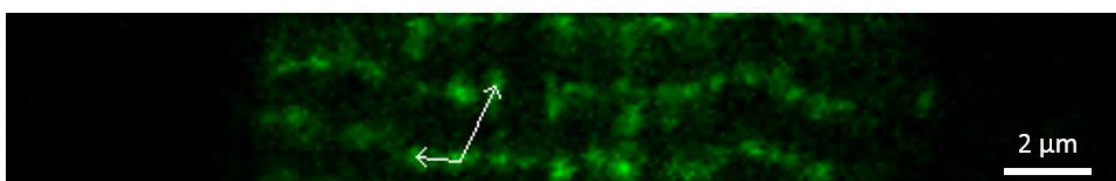


Figura 57. Trajectòria spark de 3 RyRs sota l'efecte de CIL

Un cop obtingudes les trajectòries es pot estudiar aquesta xarxa local obtenint dues la matrius d'adjacència:

- Activacions i coactivacions entre diferents clústers
- Activacions a partir del RyR2 clúster iniciador de l'esdeveniment.

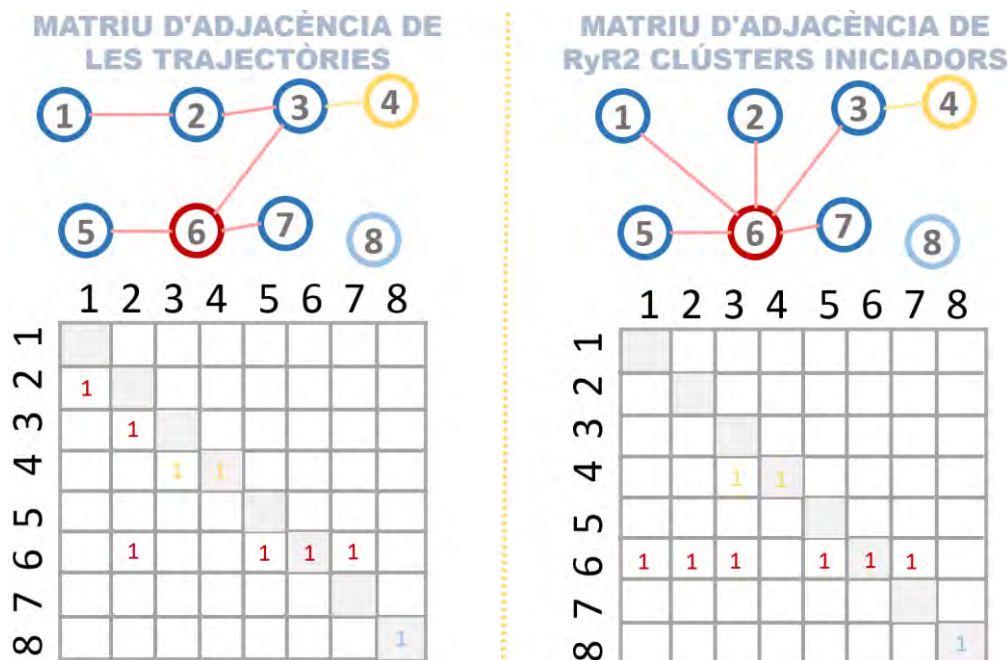


Figura 58. Matrius d'adjacència. En aquesta figura s'exemplifica el cas de 3 esdeveniments: (I) una activació simple en el RyRs 8, (II) una coactivació iniciada pel RyRs 4 que coactiva el 3 i (III) un esdeveniment de múltiples clústers que s'inicia en el RyRs 6. Es proposen dues formes de tractar aquests esdeveniments, en el panell esquerre es mostra la primera, que enllaça els esdeveniments segons la trajectòria entre RyRs, en el panell dret els esdeveniments es registren a partir del RyRs iniciador, aquesta forma es registren tots els RyRs que s'han activat després del RyRs iniciador. En les dues matrius en la diagonal es mostren les activacions simples, que no coactiven a altres veïns.

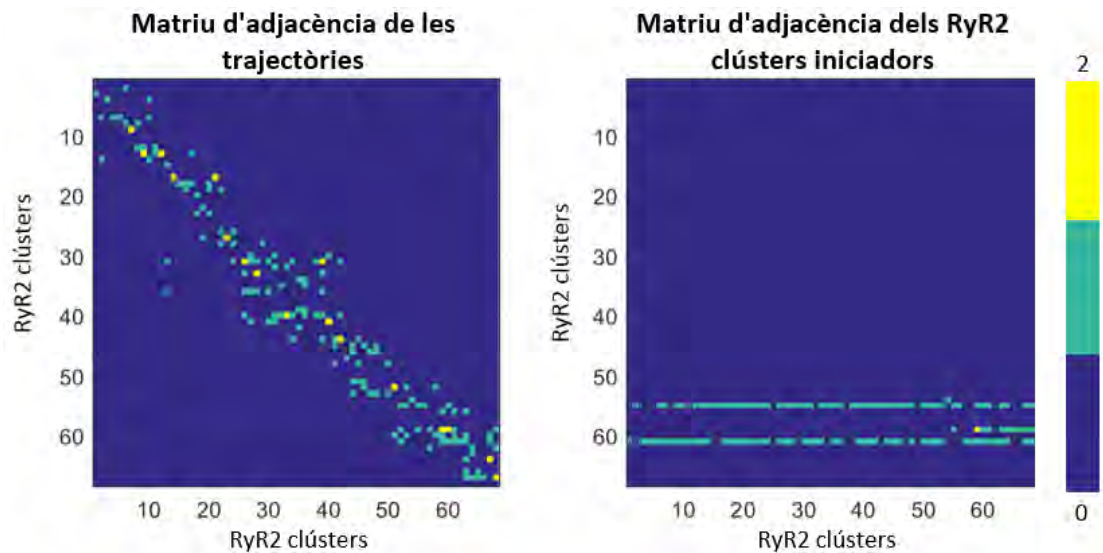


Figura 59. Matrius d'adjacència. Panell Esquerra: matriu d'adjacència de les trajectòries dels RyRs, generalment són de 2 a 8 veïns propers activats ja que és difícil físicament que activin a un veï més llunyà. Panell Dret: matriu d'adjacència dels RyR2 clústers iniciadors d'esdeveniments, en aquest cas mostra tots els RyR2 clústers de la cèl·lula que han estat activats després de la seva activació, en aquest exemple es poden observar dues *waves* i una *miniwave*.



Figura 60. Figura de la connectivitat entre RyRs. Cada node es mostra d'un color equivalent al nombre d'activacions que ha produït en la cèl·lula, els colors més freds equivalen a valors més baixos i els colors més càlids valors més alts.

### 2.3.9 Validació de la detecció

Per validar el mètode dissenyat per a la detecció de esdeveniments de calci s'ha tornat a utilitzar un model sintètic de ventricle, que correspon a una adaptació del model d'aurícula proposat per Marchena i els seus col·laboradors [53], en aquest se li han afegit els túbuls T presents en els ventricles i s'ha modificat el nombre de canals tipus C (LCC) i de intercanviadors de sodi per calci (NXC).

Per validar el programa en les condicions més similars al que s'observa en les imatges reals, s'hi ha afegit un rang de sorolls gaussians, modificant la mitjana i la desviació estàndard per simular diferents condicions de soroll i estudiar com afecta al comportament. L'augment de la mitjana representarà una major quantitat de calci o fluoròfor en les cèl·lules i l'augment de la desviació estàndard correspondrà al soroll de fotomultiplicador.



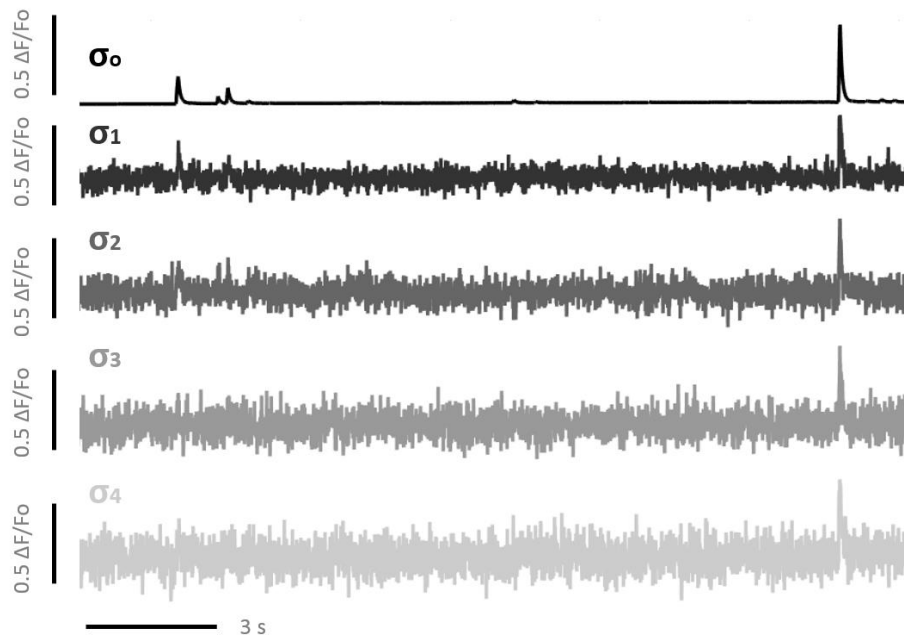


Figura 61. Exemple de senyal del model sintètic sense soroll i el mateix senyal amb soroll afegit.

També es modificarà el filtre de la amplitud, ja que és el més crític a l'hora de realitzar la detecció. En aquest cas no es tracta un filtre rígid, sinó que és un filtre depenen del soroll basal del senyal, calculat mitjançant la MAD de l'estat basal de la cèl·lula. A aquesta oscil·lació del soroll se li aplica un factor (Eq. 35) per obtenir finalment el llindar d'intensitat acceptable pels esdeveniments.

$$\text{Llindar amp} = \text{factor} \cdot \text{MAD}(\sigma_{bl}) \quad (35)$$

On  $\sigma_{bl}$  representa el soroll de l'estat basal del senyal.

Per tant el que es modificarà en la validació de la detecció és el factor utilitzat per ajustar el llindar d'amplituds.

Per corroborar quin és el millor factor per al filtratge d'esdeveniments de calci es quantifica el soroll (SNR) de les imatges. S'han escollit els experiments sense activitat per simplificar el pas de simular l'activitat o eliminar-la del registre, ja que el que interessa quantificar és el soroll ocasionat pel fotodetector.



Figura 62. A) Exemple de fotograma. B) Exemple de imatge sintètica d'estat basal de la cèl·lula.

### 2.3.10 Anàlisi estadístic

En els resultats els valors dels paràmetres es reportaran són la mitjana de les cèl·lules  $\pm$  error estàndard. Les distribucions es caracteritzaran amb la mediana i el rang interquantil. La significança estadística es reportarà mitjançant la prova Student t-test en el cas que les dades provinquin d'una distribució normal, que es comprovarà mitjançant la prova Kolmogorov-Smirnov. Les dades que no presentin una distribució normal s'avaluaran mitjançant la prova de rangs de Wilcoxon contra la hipòtesi de que les distribucions tenen medianes iguals. Els nivells de significança estadística s'expressaran com a valors p o \* per a  $p < 0.05$ , \*\* per a  $p < 0.01$  i \*\*\* per a  $p < 0.001$ . En els gràfics de barres es representarà la mitjana com a barra i l'error estàndard com a cua.

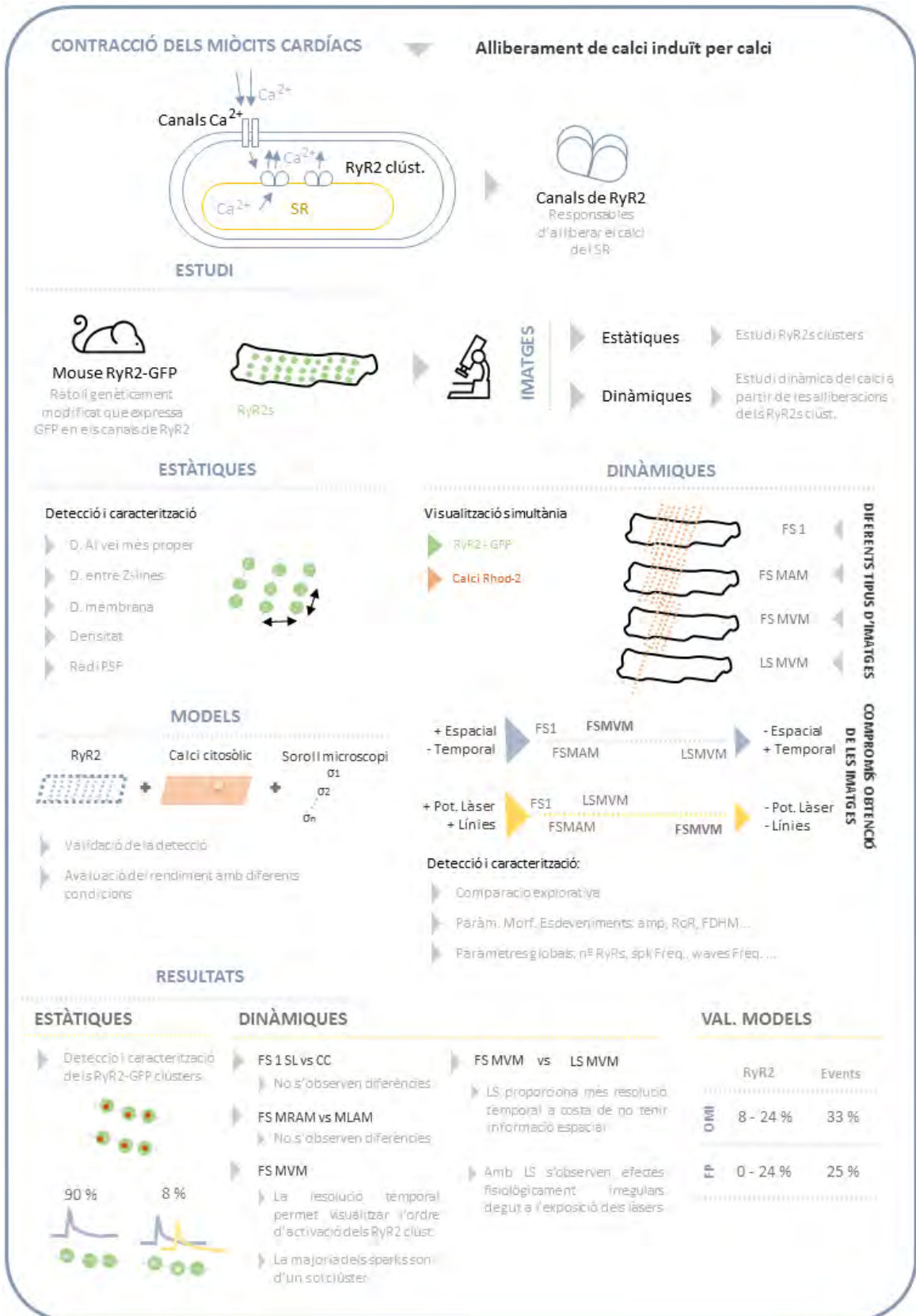
**PART II**

**RESULTATS**

# CAPÍTOL 3

**MÈTODES D'ADQUISICIÓ D'IMATGES,  
CARACTERITZACIÓ ESPACIAL DELS RYRS I  
DETECCIÓ D'ESDEVENIMENTS DE CALCI**

# ABSTRACT GRÀFIC



En el marc de l'estudi de la fisiologia del calci hi ha uns processos i metodologies establerts per obtenir dades experimentals però no hi ha clares metodologies o “*gold standard*” per d'analitzar aquestes dades. Cal afegir que hi ha un gran ventall de metodologies experimentals i això comporta també que es necessitin diverses eines d'anàlisi per extreure les dades de cada tipologia d'experiments.

Aquest estudi consisteix en sumari dels resultats obtinguts amb les eines desenvolupades, és per aquest motiu que es mostra el costat més tècnic dels estudis. L'objectiu és proporcionar un seguit de tècniques que permetin posteriorment realitzar anàlisis fisiològics més complets. Englobarà la comparació dels diferents mètodes d'obtenció d'imatges amb el microscopi confocal i els resultats preliminars dels mètodes de detecció i caracterització tant d'estructures cel·lulars i d'esdeveniments de calci. Per a cada mètode de detecció i caracterització s'ha proposat un mètode de validació per comprovar el rendiment del procediment desenvolupat.

### 3.1 OBTENCIÓ D'IMATGES

---

Totes les dades s'han obtingut al Laboratori de Regulació del Ritme cardíac i Contracció del Cor a l'Hospital de Sant Pau i la Santa Creu (IIBB-CSIC) liderat pel Dr. Leif Hove Madsen. El grup està focalitzat en l'anàlisi d'electrofisiologia de les cèl·lules cardíques. En total s'han registrat un total de 15.677.086 imatges amb microscopia confocal i un cop obtingudes han estat exportades gràcies a les llibreries de bio-formats [115] (taula 9). Aquest procés es redueix el temps de computació en les següents fases i permet l'exploració visual de les imatges sense necessitat d'utilitzar el software específic de la companyia del microscopi.

Taula 9. Nombre d'experiments i arxius exportats

<b>Exportat</b>	<b>Nombre</b>
Ratolins	46
- Ratolins amb <i>Line Scans</i>	15
Cèl·lules	530
Imatges estàtiques	538
Sèries de fotogrames de 10 s	2.129
- Imatges en 3 canals	15.671.040
Sèries de <i>Line Scans</i> de 10 s	459
- Imatges en 2 canals	5.508

## 3.2 DETECCIÓ DE D'ESTRUCTURES CEL·LULARS

La detecció de canals cel·lulars s'ha realitzat per un gran nombre de cèl·lules ja que engloben els experiments de detecció d'estructures en imatges d'immunofluorescència de cèl·lules d'humans i cèl·lules de ratolí. També s'han detectat els RyR2 clústers en les imatges de dinàmica del calci en els canals RyRs [PC1][PC2].

En tots els casos la detecció ha permès etiquetar cada RyRs i obtenir-ne els paràmetres necessaris, com ara la intensitat de fluorescència, el radi i la densitat. Aquest etiquetatge ens permet posteriorment relacionar el RyRs amb l'activitat de calci o amb les seves propietats.

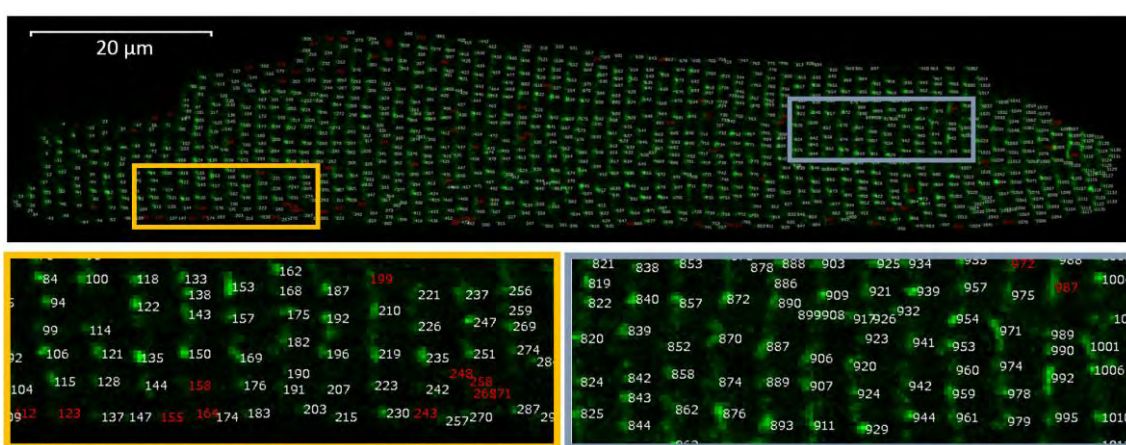


Figura 63. Detecció de RyRs i etiquetatge. Les ROIs mesuren 20 x 8 µm. Es mostren en blanc els RyRs detectats i acceptats després del filtratge, es mostren en vermell els RyRs detectats però no han superat els filtres.

El nombre total d'imatges detectades ha estat: 296 d'immunofluorescència de miòcits auriculars humans (HAM) i 125 de miòcits ventriculars de ratolí (MVM) (Taula 10).

Taula 10. Nombre de cèl·lules d'imatges d'immunofluorescència que han estat analitzades en diferents condicions fisiològiques. AF: Fibril·lació auricular, CON: Control, RO: Ro 20-1724, CIL: cilostamide, FENO: Fenoterol.

Serines	Condicions	# cèl·lules
HAM 2808	No AF	245
	AF	51
MVM 2808	CON	36
	RO	12
	CIL	5
	RO+CIL	6
	FENO	28
MVM 2814	CON	19
	RO	10
	CIL	6
	RO+CIL	3

En imatges de la dinàmica del calci de MVM de ratolí s'han detectat els RyRs en 596 imatges. Per a miòcits auriculars de ratolí (MAM) en estudis de dinàmica de calci s'han detectat 22 imatges en el cas de l'aurícula esquerra (MLAM) i 35 per a l'aurícula dreta (MRAM).

Taula 11. Nombre de cèl·lules amb RyRs detectats d'imatges de dinàmica del calci

Tipus d'experiments	# cèl·lules
<b>MVM</b>	596
- Baixa resolució temporal	38
- Alta resolució temporal	538
<b>MAM</b>	57
- Esquerra	22
- Dreta	35

### 3.2.1 Densitat de RyRs

En base a aquesta detecció ha estat possible obtenir les diferents característiques de la distribució dels RyRs en les cèl·lules. La primera d'elles és la densitat de RyRs que és pot mesurar segons la distància a la membrana cel·lular. La cèl·lula es divideix en regions de 0.75  $\mu\text{m}$  de forma concèntrica, en cada regió es calcula la densitat de RyRs. La primera regió o capa, més propera a la membrana cel·lular o sarcolemma (SL). La segona i tercera regió, representen una zona intermitja (IR). La quarta capa, a una distància de 2.25  $\mu\text{m}$  respecte la membrana, fins a l'interior l'anomenarem el centre de la cèl·lula (CC).

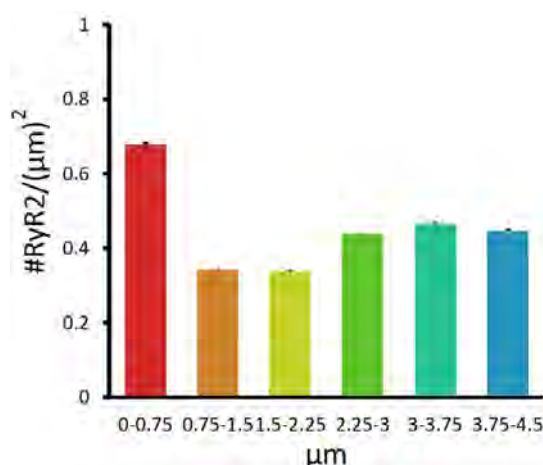


Figura 64. Distribució de densitats en les diferents capes de la cèl·lula per a cèl·lules de HAM. L'eix vertical hi ha representats els valors de densitats de les diferents capes i en l'eix horitzontal la distància de cada capa a la membrana cel·lular.

En MVM, la regió SL presenta valors de densitat de RyRs més elevats ( $0.50 \pm 0.01 \text{ RyRs}/\mu\text{m}^2$ ) que en la regió CC ( $0.54 \pm 0.02 \text{ RyRs}/\mu\text{m}^2$ ). Aquesta diferència s'exacerba encara més en les cèl·lules HAM, on la regió CC presenta uns valors de  $0.41 \pm 0.01 \text{ RyRs}/\mu\text{m}^2$  i la regió SL de  $0.64 \pm 0.01 \text{ RyRs}/\mu\text{m}^2$  (Fig. 64).



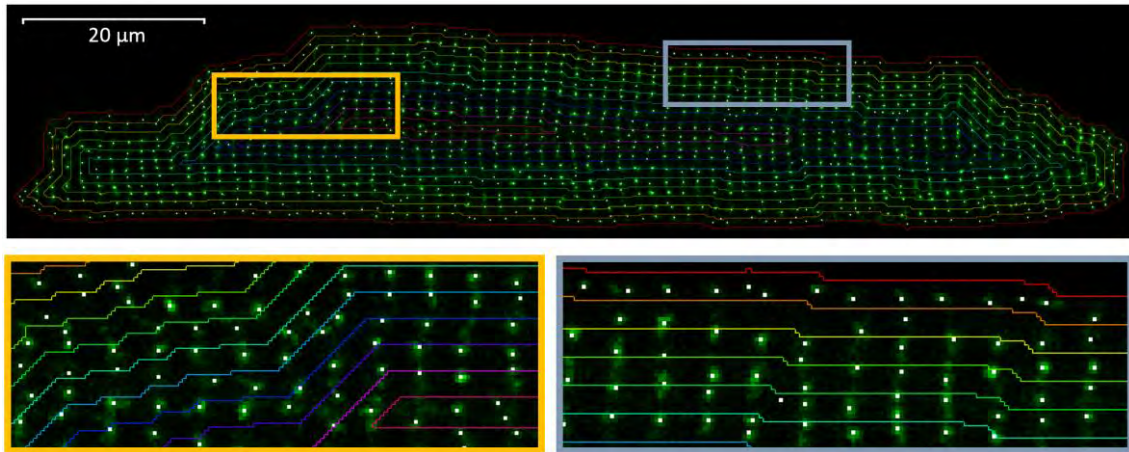


Figura 65. Capes que es tenen en compte a l'hora de calcular la densitat, cada color indica l'inici d'una nova capa. Les ROIs mesuren  $20 \times 8 \mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Distàncies característiques

Una altra possibilitat que s'obre un cop detectats els RyRs és el poder estimar el radi del RyRs i les distància entre els canals, tant la longitudinal, o distància entre *Línies Z*, com la distancia transversal, o distància entre veïns més propers (DNN).

La distància DNN, mesurada en 36 cèl·lules de MVM, és lleugerament inferior en la regió SL ( $877.6 \pm 1.2 \text{ nm}$ ) que en la regió CC ( $943.7 \pm 5.1 \text{ nm}$ ). En canvi, el radi en la regió SL ( $198.8 \pm 7.4$ ) és superior al de la regió CC ( $20.66 \pm 0.63 \text{ nm}$ ). En les 245 imatges de HAM mesurades, la DNN en la regió CC és de  $922.7 \pm 3.5 \text{ nm}$ , essent lleugerament superior a la del el SL,  $842.6 \pm 5.4 \text{ nm}$ . Per la seva part, els radis han estat  $185.7 \pm 0.18 \text{ nm}$  i  $171.1 \pm 1.6 \text{ nm}$ , respectivament..

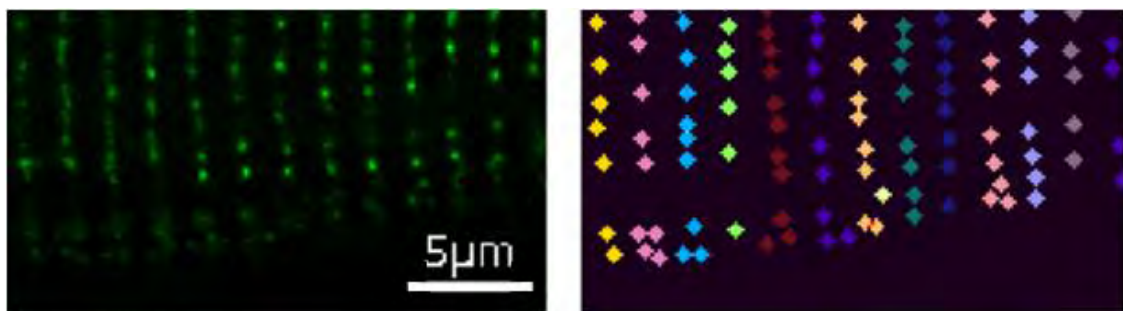


Figura 66. Segmentació de les *Línies Z*. En la imatge de l'esquerra es mostra una part de la cèl·lula amb els RyR2 marcats amb GFP. En la imatge de l'esquerra es mostren els RyR2 segmentats en línies Z, cada color correspon a una línia [PC4].

Un altre estudi s'ha realitzat a partir de 21 imatges de MVM i 20 de HAM, i s'ha seguit el procés descrit en l'apartat de metodologia (Metodologia 2.2.2.2). Les distàncies característiques obtingudes a partir de la transformada de Fourier es troben representades en la Taula 12.



### 3.2.3 Estimació del soroll

S'ha mesurat el soroll (Eq. 36) de les imatges comparant la imatge obtinguda amb el microscopi confocal amb una imatge sintètica, que consisteix en la convolució dels centroides detectats per un patró similar a la morfologia dels RyRs. D'aquesta manera s'elimina el soroll de fons del microscopi i la reflexió d'altres capes de la cèl·lula, obtenint un fons uniformement negre.

$$SNR (dB) = 10 \log_{10} SNR \quad (36)$$

Les mitjanes en els nivells de soroll obtinguts en les diverses tipologies d'imatges són:

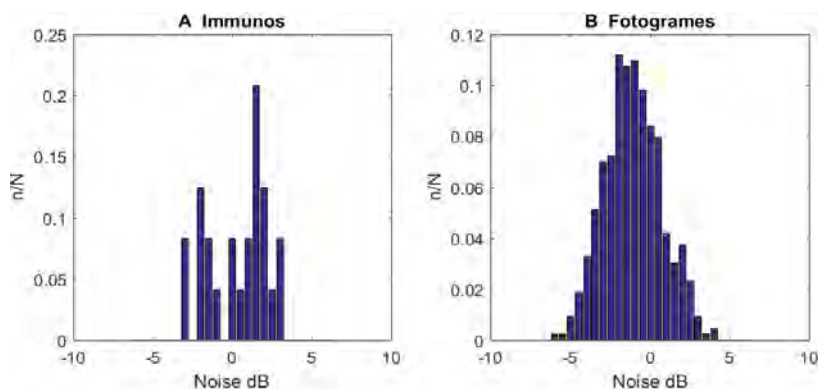


Figura 68 . Nivell de soroll en les diferents imatges

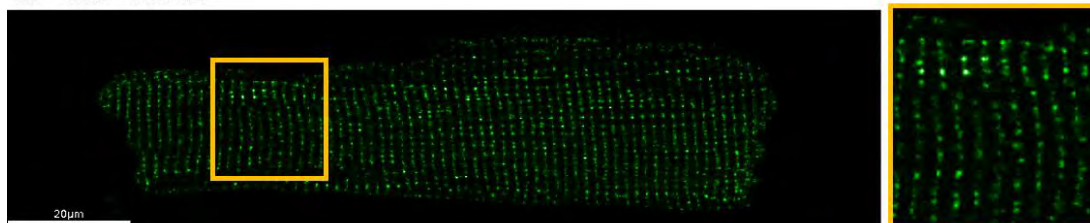
Taula 14. Nivell de soroll en les diferents tipologies d'imatge, s'ha quantificat la mitjana, l'error estàndard (S.E.), el mínim i el màxim, de cada tipologia d'imatges.

Tipologia d'imatge	Mitjana (dB)	S.E. (dB)	Mínim (dB)	Màxim (dB)
Immunofluorescència (n = 24)	0.3615	0.0792	2.89	-3.06
Escaneig de fotogrames (n = 428)	-1.08	0.0042	4.16	-6.05

A continuació es mostra un exemple de cada imatge per al valor mitjà de soroll i el valor màxim de soroll que podem observar en cada cas:

#### Immunofluorescència

A SNR = 0.89 dB



B SNR = -3.05 dB

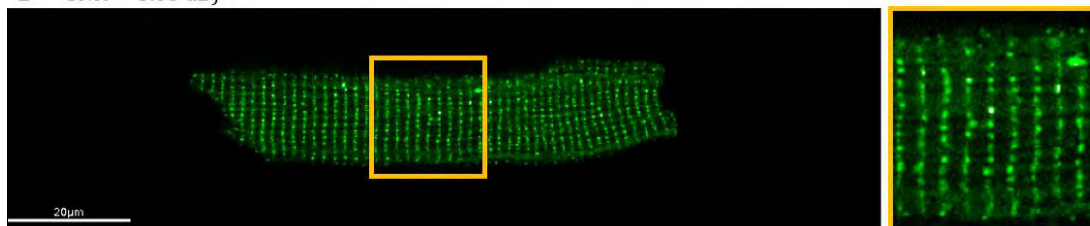
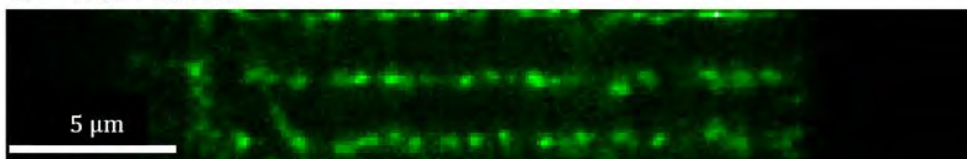


Figura 69. Exemple soroll en imatges immunofluorescència

## Acumulació de 450 ms de fotogrames

A SNR = -1.34 dB



B SNR = -6.04 dB

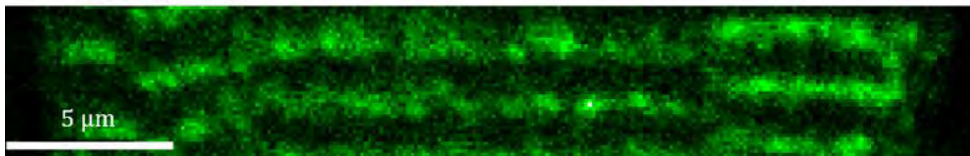


Figura 70. SNR Estimació del soroll en les imatges de seqüència de fotogrames

Només amb l'examinació visual podem inferir que la caracterització no serà igual de clara i concisa per a les imatges amb un elevat nivell de soroll. També cal destacar que s'observen millors resultats en el cas de les imatges de immunofluorescència. Això és degut a la manca de moviment del medi, a diferència de les cèl·lules *in vivo*. En aquest cas, tot i que les cèl·lules es fixen i s'intenta realitzar els registres de les cèl·lules que no hagin experimentat esdeveniments de propagació, la perfusió dels fàrmacs en el medi pot ocasionar un lleu moviment i això pot afectar en la resolució de la imatge final. També cal afegir que en les imatges de dinàmica del calci, la intensitat del làser és inferior per tal de no modificar la fisiologia de la cèl·lula i obtenir imatges de l'activitat en condicions normals. La intensitat del làser també pot ajudar a obtenir millors resultats però té conseqüències fisiològiques. S'ha d'escollir el millor balanç entre la bona visualització i l'estat de les cèl·lules respecte la intensitat del làser.

### 3.2.4 Validació

La validació s'ha realitzat seguint el procés esmentat en la metodologia (Metodologia 2.2.4), s'ha utilitzat imatges sintètiques simulant la distribució de RyRs i han estat convolucionades per una PSF per tal de simular l'efecte de la difracció del microscopi. Partint d'aquestes imatges, que serien el cas ideal, s'ha anat augmentant el nivell de soroll utilitzant un soroll gaussià.

Aquesta distribució de soroll s'ha modificat, en aquest cas els paràmetres incrementats han estat la mitjana de la distribució per simular l'augment del *baseline* i la desviació estàndard per simular l'efecte del fotodetector. Les modificacions s'han realitzat de forma simultània, per un augment de la mitjana també s'ha augmentat la desviació estàndard, s'augmenta al mateix temps el nivell de soroll del *baseline* i el del foto detector.

Per posar a prova el programa, s'ha modificat el paràmetre que és més rellevant a l'hora obtenir una bona detecció dels RyRs, la intensitat. S'ha escollit un ventall des de 0 % al 100 % d'intensitat per definir els límits de permissivitat del filtre en les diferents condicions simulades.

Finalment, s'ha aplicat aquest procés a 16 models d'imatges sintètiques de distribució de RyRs, per 11 nivells de soroll i per a 11 nivells llindars d'intensitat diferents. A partir d'aquestes dades s'han obtingut les corbes d'omissions i falsos positius, les quals s'utilitzaran com a indicadors del rendiment del programa.

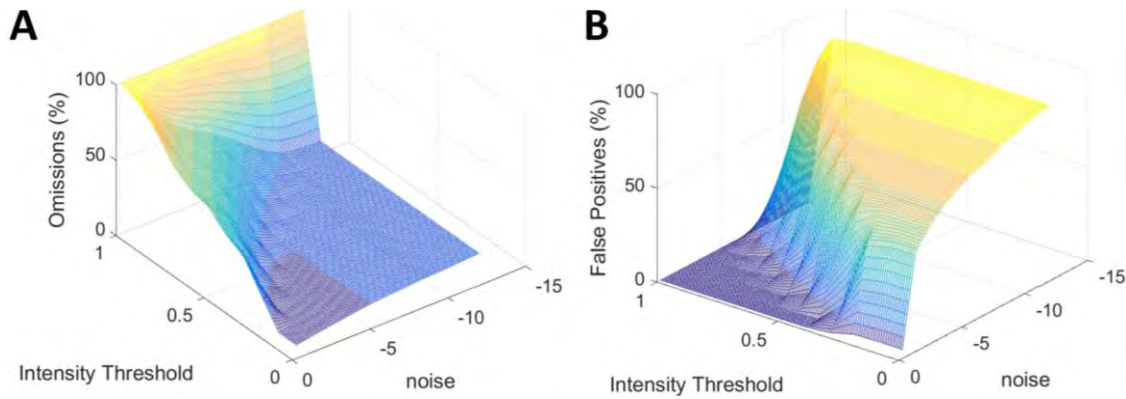


Figura 71. A) Eix z: percentatge d'omissions, eix x: nivell de llindar d'intensitat i eix y: nivell de soroll. B) Eix z: percentatge de falsos positius respecte, eix x: nivell de llindar d'intensitat i eix y: nivell de soroll.

Es pot observar que en absència de llindar d'intensitat les imatges ja tenen un percentatge basal d'omissions. Això és degut a que en els models apareixen clústers RyRs molt més petits que el programa no detecta. Aquest fet és degut a que en les imatges d'immunofluorescència no es pot determinar si aquests petits punts estan en el mateix pla focal o no, per tant, el mateix programa conté un filtre de radi mínim per descartar la sobredetecció de RyRs fora del pla focal.

També es pot apreciar que les imatges que contenen un nivell més elevat de soroll mostren d'un percentatge d'omissions més elevat, ja que els RyRs amb menys intensitat o radis més petits es difonen sota l'augment de soroll. A més, es pot veure que en nivells elevats de soroll hi ha clarament una sobredetecció d'estructures perquè els nivells d'omissions no varien tot i modificar el llindar d'intensitat. En aquest aspecte serà també molt útil observar les corbes de les falses deteccions per corroborar-ho, on s'observa un alt nivell de falsos positius. Per tant, es pot afirmar que a mesura que s'augmenta el soroll també s'augmenta el percentatge de falses deteccions.

Observant la gràfica de les falses deteccions també es pot veure que es parteix des d'un percentatge força elevat si no s'aplica el filtratge d'intensitat, però que gràcies a aquest llindar es pot disminuir el nombre de falsos positius i per tant millorar el rendiment de la detecció.

Per últim, cal destacar que el programa, en cas d'absència de soroll té un 0 % de falsos positius, cosa que ens indica que l'algoritme és centra en descartar la falsa detecció d'una manera molt robusta i prioritza que el que es classifica com a RyRs és una estructura real.

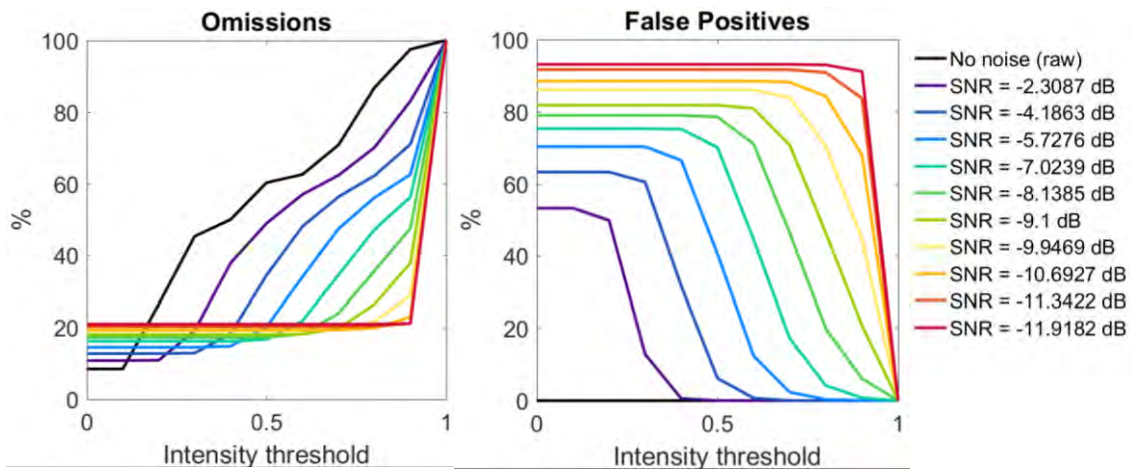


Figura 72. Representació 2D de les gràfiques anteriors, cada color representa un nivell de soroll.

A l'hora de trobar el compromís desitjat entre nombre d'omissions i nombre de falsos positius s'ha escollit el llindar més òptim segons el soroll estimat per a cada una de les tipologies d'imatges. Els nivells de soroll mitjans ronden el 0.36 dB en imatges d'immunofluorescència i -1.08 dB en imatges temporals de fotogrames (Taula 14). Els casos més extrems es troben a -3.06 dB i -6.05 dB respectivament. És per aquest motiu que s'han escollit diferents nivells de soroll en aquest rang per analitzar com varia la selecció òptima del llindar d'intensitat. Per últim, tenint en compte que la majoria d'imatges es situen entre els panells A i B de la figura 73, els llindars haurien de situar-se entre el 0.00 i 0.30, obtenint un rendiment d'entre 8-24% d'omissions i 0-24% de falsos positius.

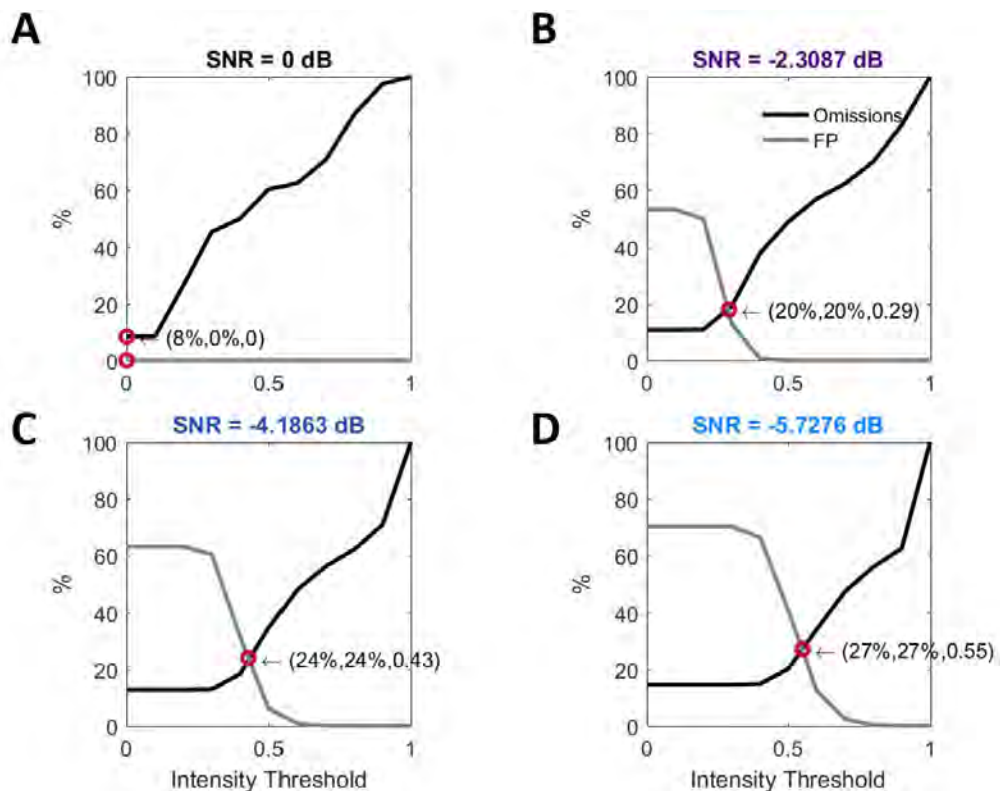


Figura 73. Llindars d'intensitat òptims per a cada nivell de soroll

### 3.3 MÈTODES DE REGISTRE DE L'ACTIVITAT DE CALCI

---

S'han registrat imatges temporals emprant dos mètodes diferents en motiu de comparar les diferents característiques que ens ofereixen cada un. Els mètodes han estat el registre temporal de fotogrames (FS) i el registre temporal de línia (LS). Per al primer mètode s'han registrat experiments de 16 ratolins (530 cèl·lules) i per al segon mètode 15 ratolins (153 cèl·lules).

Només per la naturalesa de cada mètode es pot apreciar que amb el LS es perdrà informació espacial de la dinàmica del calci a través de la cèl·lula.

Dintre de les mateixes tipologies d'imatges s'han realitzat diversos registres per jugar amb les diferents resolucions, tan temporals com espacials. A en la taula 15 es mostra la variació de les mesures dels píxels per les diferents modalitats:

Taula 15. Diferents resolucions de les modalitats d'imatge

Tipologia d'imatge	Píxels	Resolució espacial	Resolució temporal
FS	256 x 64	0.12 $\mu\text{m}$ /píxel	5.8 ms
FS	256 x 40	0.12 $\mu\text{m}$ /píxel	4.2 ms
LS	256 x 1	0.12 $\mu\text{m}$ /píxel	0.13 ms
LS	512 x 1	0.06 $\mu\text{m}$ /píxel	0.13 ms

Es pot apreciar que en les línies verticals el nombre de píxels afecta molt a la resolució temporal dels registres, quantes més línies verticals més temps tarda en realitzar l'escaneig, això és degut a la forma en que el microscopi confocal excita la mostra. Per realitzar el registre, la direcció del làser és dictada per dos miralls, un que rota per escanejar la línia horitzontal i un segon que rota més a poc a poc, que és l'encarregat de canviar la direcció en l'eix vertical. A causa de que el mirall de l'eix horitzontal rota amb molta velocitat, no pot parar i canviar de sentit sobtadament al final de la línia, per tant, hi ha un temps de frenada del mirall que es tradueix en un augment del temps d'escaneig. En aquest cas, l'escaneig es realitza de forma bidireccional, de manera que es perd menys temps per realitzar el canvi de línia ja que comença a escanejar a l'extrem oposat i el mirall no ha de retornar a la posició inicial. Tot i guanyar en l'aspecte temporal del registre, aquest procediment genera problemes amb la fase entre les línies, que s'ha de corregir manualment per evitar aquest desfasament en la imatge.

A continuació es mostra una comparació visual de les significants diferències entre els mètodes (Fig. 74). La primera dissimilitud evident de les seqüències temporals és que unes estan formades per fotogrames i l'altra només per línies, per tant en una s'hi visualitzarà l'evolució d'una regió i en l'altre l'evolució d'una línia.

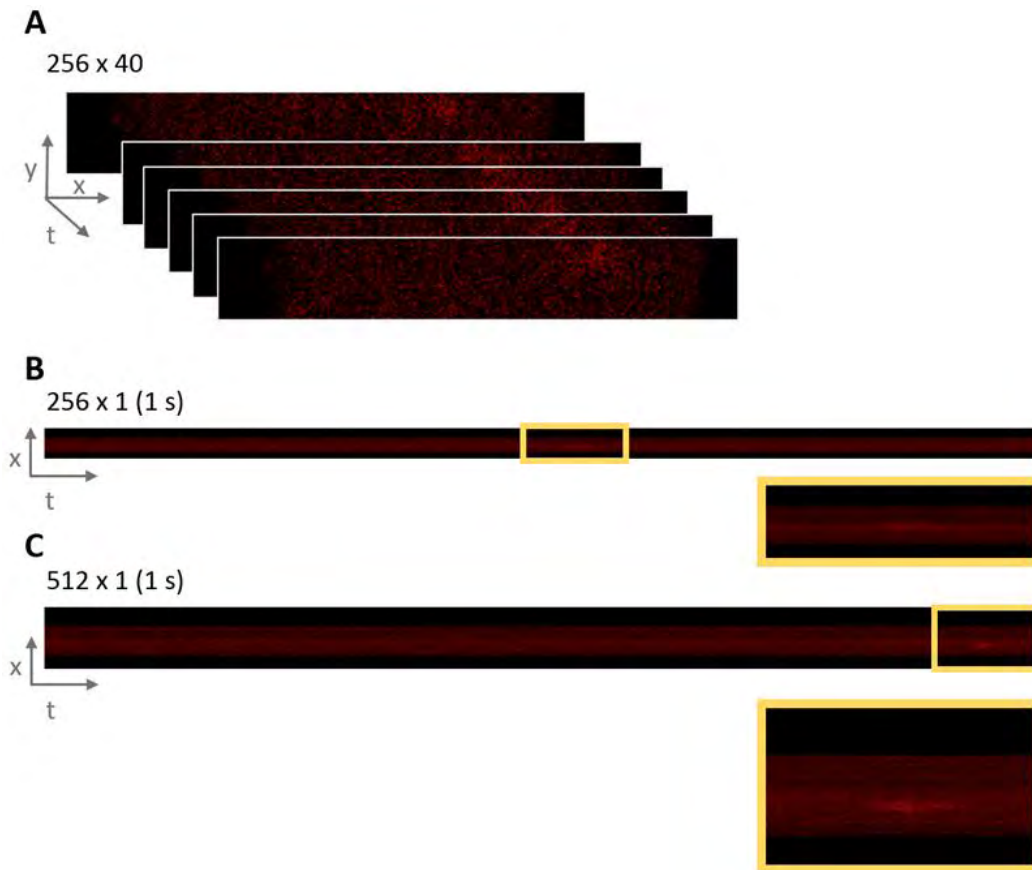


Figura 74. Exemples de tipologies d'imatge i diferents resolucions

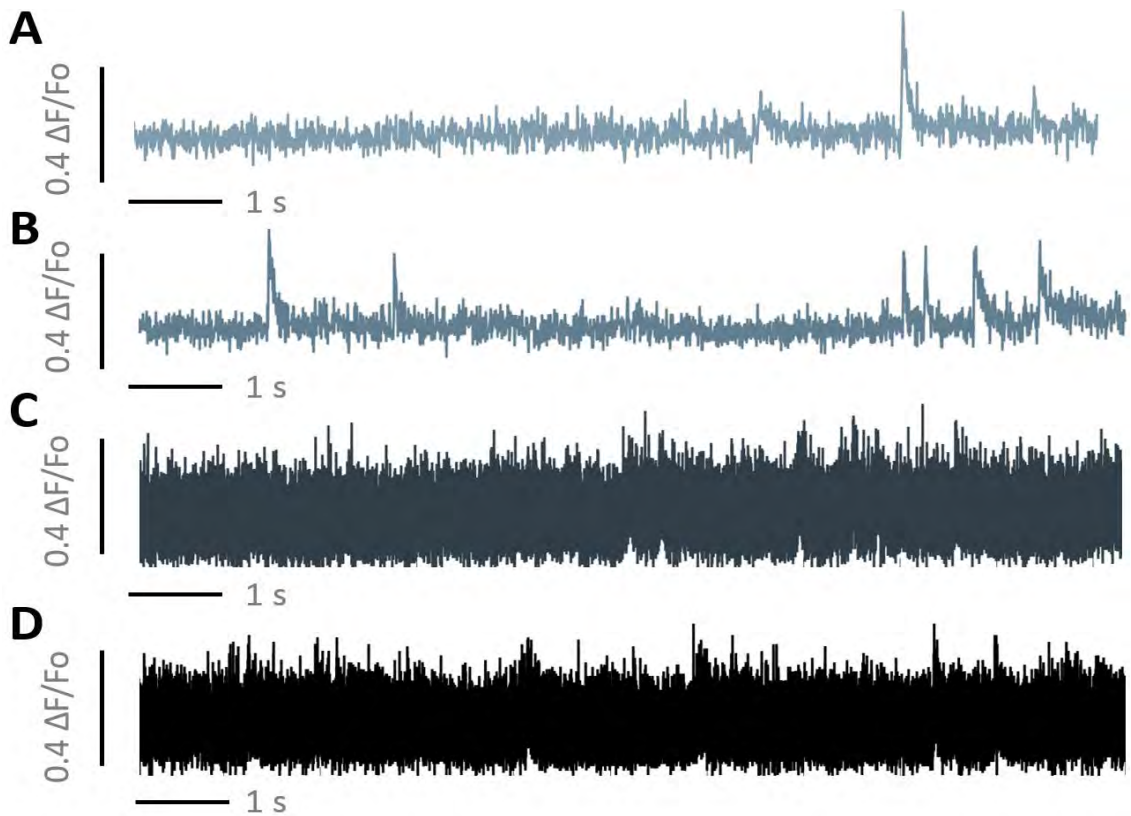


Figura 75. Senyals obtinguts amb els diversos mètodes de registre. A) 256 x 64. B) 256 x 40. C) 256 x 1. D) 512 x 1.



Una altra diferència característica és que les imatges de LS tenen més punts en l'eix temporal, per tant es visualitzaran molt allargades. A vegades, aquesta representació dificulta l'observació d'esdeveniments a primera vista. Observant els senyals obtinguts es fa més evident el motiu pel qual és difícil realitzar l'exploració visual dels LS, al obtenir moltes mostres també s'obté molt soroll que impossibilita visualitzar la morfologia del senyal de calci, com es pot veure en la figura 75 D i C. Per solucionar aquesta problemàtica i poder analitzar les dades, els senyals de *LS* es filtren per recuperar la morfologia del calci. Aquests senyals mostren uns nivells molt elevats de soroll d'alta freqüència. És per aquest motiu que s'ha escollit un filtre de mitjana amb una finestra temporal de 5 ms. D'aquesta manera s'obtenen uns senyals més suavitzats i apareixen les morfologies característiques del calci.

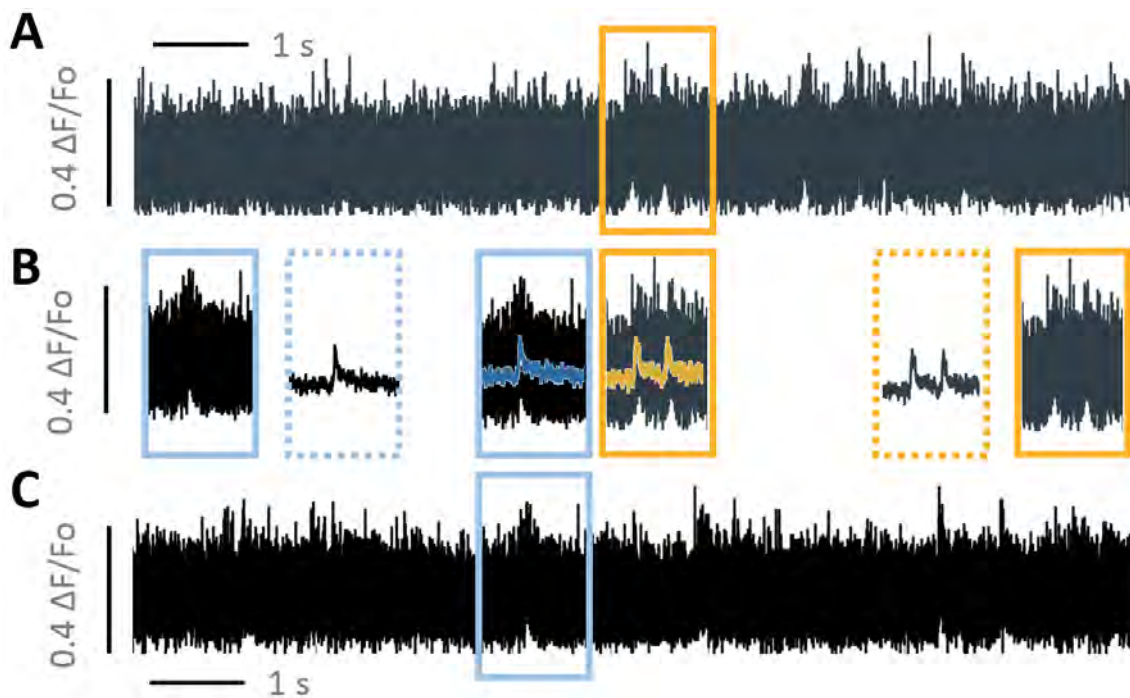


Figura 76. Filtratge dels senyals *LS*. A) Senyal 256 x 1. B) Exemples de *sparks* abans i després d'aplicar el filtratge. C) senyal 512 x 1.

Per altra banda, el fet de treballar amb una resolució temporal 30 vegades més ràpida permet discrepar entre soroll o activitat de calci. S'ha observat que hi ha *sparks* de duració més prolongada i amplitud més gran en les seqüències FS, però no es pot diferenciar si en el mateix esdeveniment hi ha subactivacions del clúster de RyRs. En canvi, amb els registres d'escaneig de línia es poden arribar a veure aquestes activacions dintre del mateix clúster, ja que la resolució temporal permet diferenciar el pic de les activacions del soroll (Figura 77).

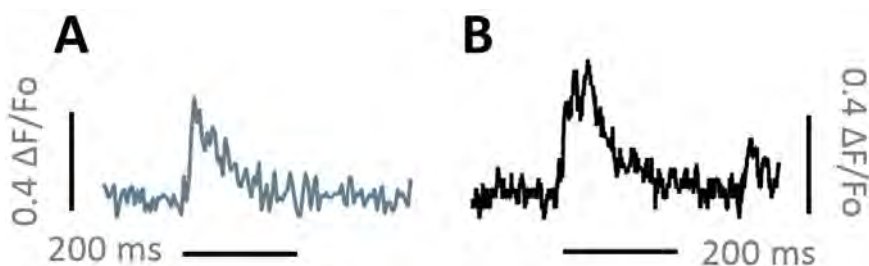


Figura 77. Exemples d'*sparks*. A) Senyal d'una seqüència de 256 x 40. B) Senyal d'una seqüència de 512 x 1.

A l'hora de realitzar els registres també s'ha de tenir en compte que els làsers del microscopi confocal són citotòxics per la cèl·lula, per tant cal evitar realitzar registres amb una potència molt elevada o bé evitar escanejar sempre el mateix punt, ja que es centra tota l'energia en una part molt localitzada de la cèl·lula. La toxicitat dels làsers pot arribar a modificar la fisiologia de la cèl·lula o bé arribar a provocar l'apoptosi. El fet de que l'escaneig de línia sempre passi pels mateixos punts de la cèl·lula i més vegades, ja que no necessita el temps per saltar de línies, el converteix en un mètode potencialment més citotòxic.

Taula 16. Resum característiques de cada mètode d'obtenció d'imatges

	<i>FS</i> 256 x 64	<i>FS</i> 256 x 40	<i>LS</i>
Dinàmica del calci ( <i>STIMs, waves...</i> )	✓	✓	✓
Obs. De <i>sparks</i>	✓	✓	✓
Obs. Δt entre activacions de RyRs	↓	↑	↑↑
Obs. Subactivacions del mateix clúster	↓	↓	↑
Obs. Trajectòries (x,y)	↑	↑	↓
Suavitzat del senyal	↑↑	↑	↓
Citotoxicitat	↓↓	↓	↑

## 3.4 DETECCIÓ I CARACTERITZACIÓ D'ESDEVENIMENTS

La detecció i caracterització d'esdeveniments s'ha realitzat per a les diferents tipologies d'imatge en diversos estudis. En cada cas ha aportat un anàlisi per tenir una imatge més global de les diferents característiques de cada mètode d'obtenció d'imatges i l'activitat de calci.

### 3.4.1 Caracterització d'esdeveniments de baixa resolució temporal

Primer es van analitzar les dades fruit de la col·laboració amb el laboratori del Professor Dr. S.R Wayne Chen de la Universitat de Calgary [117]. Aquestes dades inicials consistien en imatges de MVM obtingudes amb microscopia TIRF i confocal. Presentaven una resolució espacial de 0.1 μm i una resolució temporal baixa, concretament de 20.4 ms. Es van realitzar amb l'objectiu d'estudiar la dinàmica espontània de calci en l'interior i la membrana de la cèl·lula.

Amb l'objectiu de caracteritzar les diferències entre MAM d'aurícula dreta (MRAM) i esquerra (MLAM), es van obtenir un altre set d'imatges al mateix laboratori amb una resolució espacial de 0.1 μm i temporal de 18.2 ms.

Taula 17. Dades del laboratori de la Universitat de Calgary

Tipus d'experiments	# cèl·lules
<b>MVM</b>	16
- TIRF	10
- Confocal	16
<b>MAM</b>	57
- Esquerra	22
- Dreta	35

Els resultats obtinguts de l'anàlisi dels MVM en l'interior (Int.) i la membrana (SL) de la cèl·lula no mostren diferències estadísticament significatives (test Wilcoxon) entre la morfologia de les activacions de calci ni en imatges de microscopia TIRF ni en imatges de microscopia confocal (Figura 78, panell B).

8

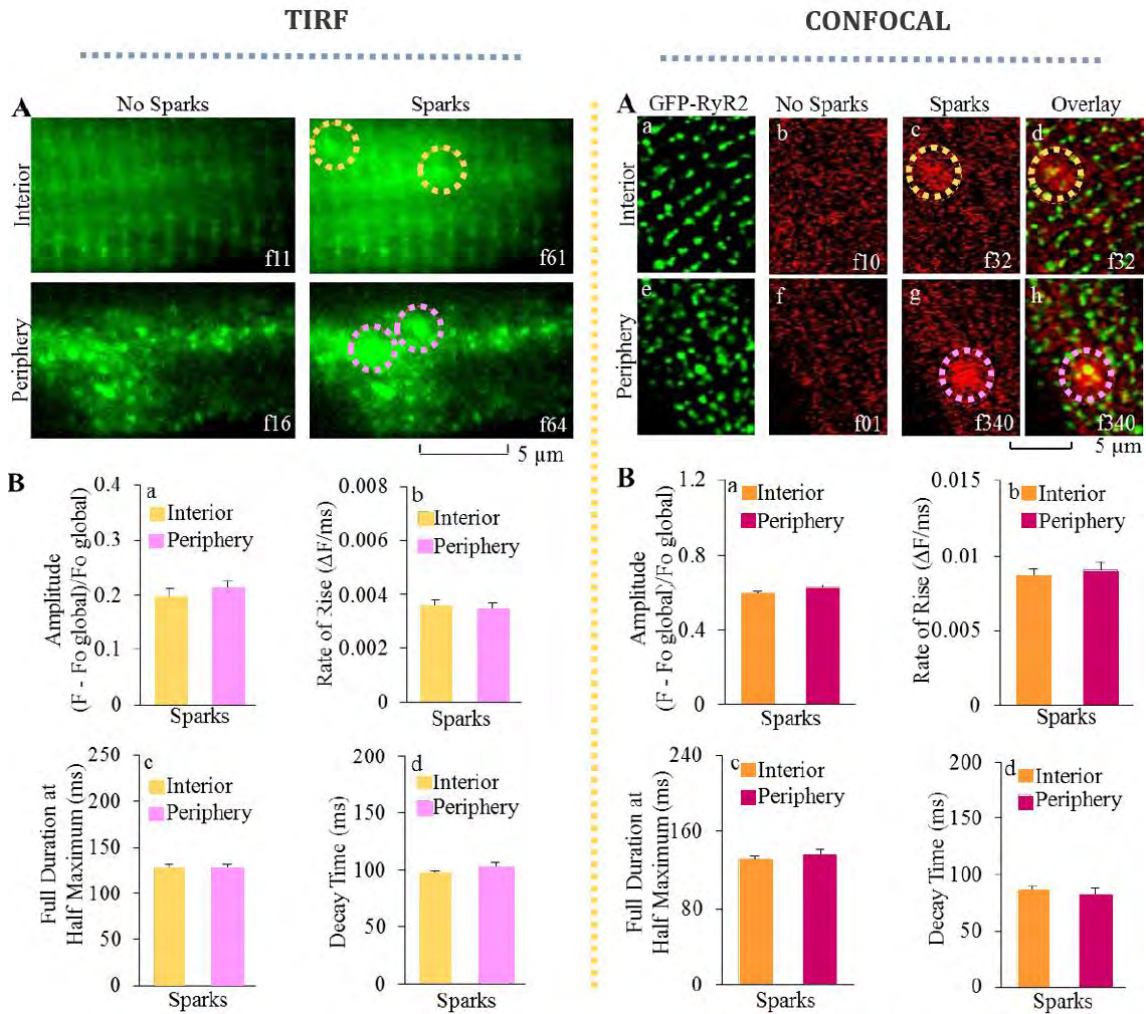


Figura 78. Comparació del paràmetres en l'interior (Interior) i l'exterior de la membrana (Periphery) de les cèl·lules. Panell esquerre mostra els resultats en imatges de microscopia TIRF. En el panel dret els resultats en imatges de microscopia confocal. Els panells A mostren exemples de les imatges i en els panells B els paràmetres morfològics dels *sparks* obtinguts. Aquesta figura pertany a l'article de Florian Heiss et. al. de 2017 [117].

Cal assenyalar que s'observen certes discrepàncies entre els paràmetres de les imatges de microscopia TRIF i confocal. Això pot ser degut a la potència del làser o com insereix en la cèl·lula, si de forma més directa o indirecta.

Taula 18. Resultats de l'anàlisi de la morfologia de les activacions de RyRs en interior i SL de les cèl·lules.

		<b>Amplitud</b> $\Delta F/F_0$	<b>RoR</b> $(\Delta F/F_0)/\text{ms}$	<b>FDHM</b> ms	<b>Const. Decaïment</b> ms
<b>TRIF</b>					
·	Int	$0.19 \pm 0.02$	$0.0035 \pm 0.0003$	$127.94 \pm 4.33$	$95.35 \pm 4.04$
·	SL	$0.21 \pm 0.01$	$0.0034 \pm 0.0003$	$125.87 \pm 5.08$	$101.55 \pm 4.68$
<b>CONFOCAL</b>					
·	Int	$0.59 \pm 0.01$	$0.0087 \pm 0.0004$	$153.08 \pm 3.25$	$84.96 \pm 4.62$
·	SL	$0.62 \pm 0.01$	$0.0091 \pm 0.0005$	$157.33 \pm 7.17$	$82.69 \pm 4.96$

Es van analitzar 22 imatges de MLAM i 35 de MRAM, de les quals s'ha obtingut 267 i 197 *sparks* de 366 i 265 activacions, respectivament. El nombre de RyRs estudiats en MLAM ha estat de 1190 i només s'han detectat activacions en 263. En el cas de MRAM van ser activats 216 de 1235 RyRs estudiats. No s'observen diferències significatives entre els 2 grups de MAM (Figura 79, Taules 19 i 20).

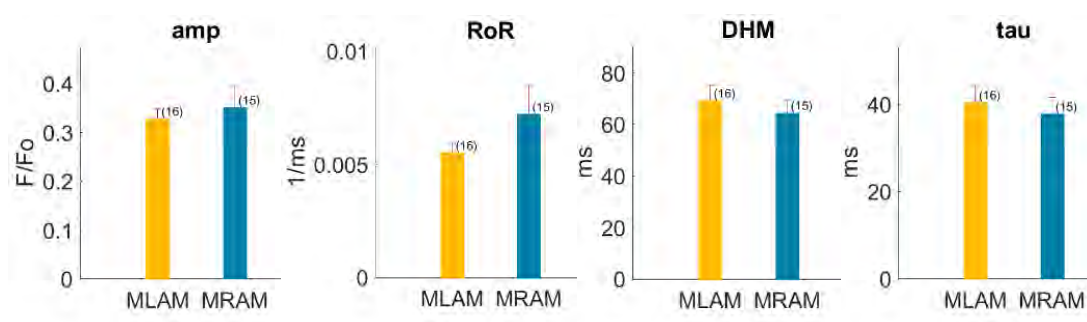


Figura 79. Paràmetres de la morfologia de les activacions en MAM.

Taula 19. Paràmetres de la cinètica de les activacions des RyR2 clústers

<b>ACTs.</b>	<b>Amplitud</b> $\Delta F/F_0$	<b>RoR</b> $(\Delta F/F_0)/\text{ms}$	<b>FDHM</b> ms	<b>Const. Decaïment</b> ms
<b>MLAM</b>	$0.33 \pm 0.01$	$0.005 \pm 0.001$	$69.19 \pm 5.08$	$40.34 \pm 3.28$
<b>MRAM</b>	$0.36 \pm 0.03$	$0.007 \pm 0.001$	$63.97 \pm 3.51$	$37.51 \pm 2.60$

Taula 20. Paràmetres morfologia de *sparks* en MAM

<b>SPKs</b>	<b>Amplitud</b> $\Delta F/F_0$	<b>RoR</b> $(\Delta F/F_0)/\text{ms}$	<b>FDHM</b> ms	<b>Const. Decaïment</b> ms	<b>FWHM</b> $\mu\text{m}$
<b>MLAM</b>	$0.09 \pm 0.01$	$0.0013 \pm 0.0014$	$111.02 \pm 4.36$	$83.81 \pm 4.94$	$1.57 \pm 0.13$
<b>MRAM</b>	$0.13 \pm 0.02$	$0.0023 \pm 0.0049$	$101.99 \pm 7.27$	$72.07 \pm 4.07$	$1.52 \pm 0.18$

La massa del senyal de fluorescència del *sparks* és  $14.12 \pm 1.51$  a.u. per les cèl·lules MLAM i  $17.68 \pm 3.31$  a.u. per MRAM ( $p=0.73$ ).

No només no difereixen en la morfologia dels esdeveniments sinó que tampoc s'aprecien canvis en la dinàmica del calci, com ara el nombre de RyRs activats amb els *sparks* o en les freqüències d'activació, d'*sparks* i de *waves*.

Taula 21. Nombre de RyRs activats en els *sparks*

#RyR2 en SPK	1 RyR2 (%)	2 RyR2 (%)	3 RyR2 (%)
<b>MLAM</b>	$78.54 \pm 3.10$	$11.14 \pm 1.67$	$10.31 \pm 1.77$
<b>MRAM</b>	$81.02 \pm 3.05$	$10.94 \pm 2.13$	$8.03 \pm 2.24$

La freqüència d'activacions, la freqüència de *sparks* i la freqüència de *waves* tampoc mostren canvis estadísticament significatius (test Wilcoxon):

Taula 22. Freqüències d'activacions, *sparks* i *waves* en MAM

FREQ.	Activacions #clustAct/ms	Sparks #nSpk/(ms· $\mu\text{m}^2$ )	Waves #waves/(ms· $\mu\text{m}^2$ )
<b>MLAM</b>	$4.38 \cdot 10^{-6} \pm 0.45 \cdot 10^{-6}$	$2.82 \cdot 10^{-6} \pm 0.16 \cdot 10^{-6}$	$5.44 \cdot 10^{-7} \pm 2.36 \cdot 10^{-7}$
<b>MRAM</b>	$1.1927 \cdot 10^{-6} \pm 0.06 \cdot 10^{-6}$	$0.64 \cdot 10^{-6} \pm 0.02 \cdot 10^{-6}$	$7.33 \cdot 10^{-7} \pm 4.57 \cdot 10^{-7}$

En nombre de coactivacions de parelles de RyRs tampoc mostra diferències estadísticament significants.

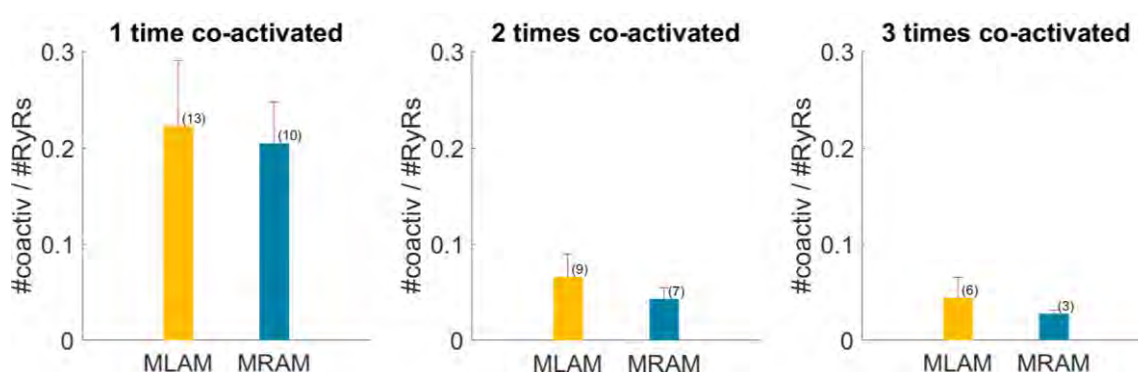


Figura 80. Recompte de vegades que s'ha coactivat una parella de RyRs, les barres representen la mitjana  $\pm$  l'error estàndard.

### 3.4.2 Caracterització d'esdeveniments d'alta resolució temporal

La caracterització d'esdeveniments d'alta resolució temporal s'ha realitzat per a 64 cèl·lules provinents de 16 ratolins. La resolució espacial d'aquestes imatges és de  $0.12 \mu\text{m}$  i la resolució temporal és de  $4.16 \text{ ms}$  que és aproximadament una quarta part de les resolucions obtingudes en les imatges anteriors,  $20 \text{ ms}$  i  $18.2 \text{ ms}$ . Aquest temps més curt entre fotogrames ens ha permès estudiar més a fons les activacions dels RyRs i la seva dinàmica.

De les 64 cèl·lules analitzades s'han activat 228 RyRs dels 3335 RyRs analitzats, Aquests conjunt de RyRs ha donat lloc a 606 activacions, les quals han estat agrupades en 467 *sparks* de activació d'un RyRs, 53 *sparks* de dues activacions conjuntes de dos RyRs i 11 *sparks* de tres RyRs coactivats.

Gràcies a l'alta velocitat temporal del registre s'ha pogut determinar que un  $91.43 \pm 2.03 \%$  dels *sparks* provenen de activacions d'un sol RyRs i que un  $8.04 \pm 1.64 \%$  de *sparks* d'activacions de dos RyRs. ( $p < 0.001$ ). Dins del grup de *sparks* de dos clústers, el 85% tenen lloc en parelles de RyRs contigües de la mateixa línia Z, el 15% restant són activacions RyRs de línies Z veïnes. El temps en que es tarda de mitjana a activar el segon RyRs és de  $9.98 \pm 0.38 \text{ ms}$ .

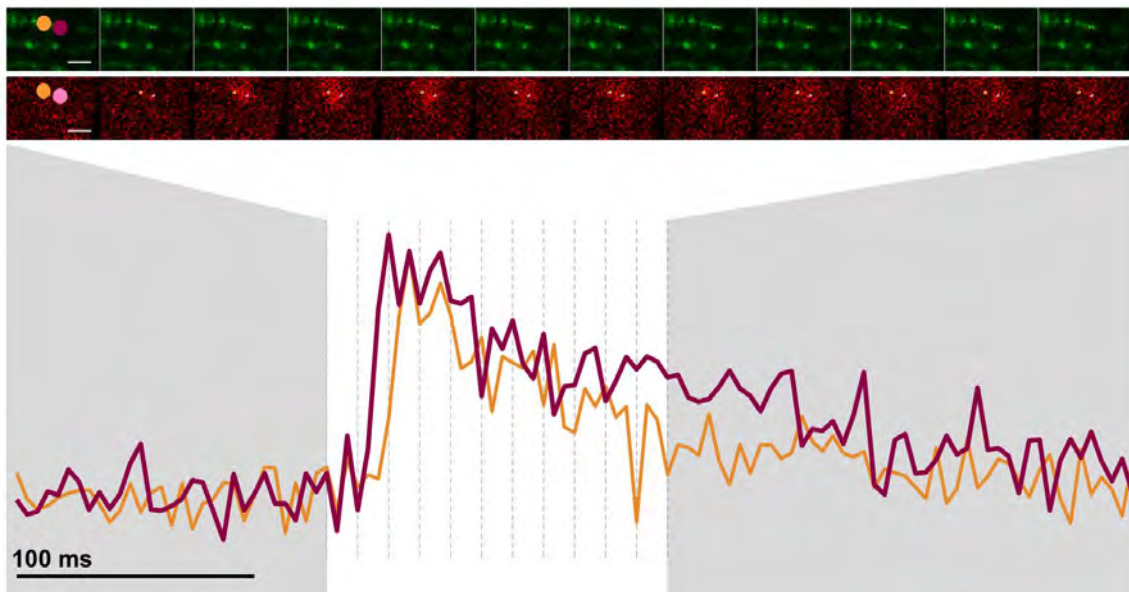


Figura 81. Exemple de *spark* amb dos RyRs activats en temps diferents.

De la mateixa forma que pels experiments de baixa resolució temporal s'ha volgut quantificar els paràmetres morfològics dels senyals de calci referents a les activacions, obtenint els següents resultats: l'amplitud global de les activacions de RyRs és de  $0.48 \pm 0.02 \Delta F/F_0$ , la ràtio de pujada del calci és de  $0.025 \pm 0.001 (\Delta F/F_0)/\text{ms}$ , el temps fins el pic de les activacions ( $t_{2p}$ ) té una durada de  $19.96 \pm 0.88 \text{ ms}$ , mentre que la durada completa a mig màxim és de  $24.76 \pm 1.05 \text{ ms}$ , per últim la constant de decaïment ( $\tau$ ) és de  $28.34 \pm 2.06 \text{ ms}$ . La freqüència d'activacions de RyRs és de  $7.18 \cdot 10^{-6} \pm 1.93 \cdot 10^{-6} \text{ activacions/ms}$ .

Al ser una detecció molt localitzada aquest paràmetres es mostren amb altes amplituds i curtes durades. El motiu ve donat pel diàmetre de la ROI, quan més petit amb menys píxels genera el valor del senyal i per tant no queden emmascarats els valors màxims amb els valors de fons de no *spark*. En el cas dels *sparks* s'espera una disminució en l'amplitud i augment en la constant de decaïment pel fet d'emprar un diàmetre més gran per a la ROI dels senyals, fet que propiciarà a que hi hagi una captació més extensa en àrea de la difusió del calci.

Agrupades les activacions en *sparks* es mesuren els paràmetres morfològics per aquests esdeveniments globals. En condicions de control, a una temperatura ambient de 37°C, la amplitud de les activacions és de  $0.11 \pm 0.01 \Delta F/F_0$ , la ràtio d'elevació del calci (RoR) és  $0.004 \pm 0.001 (\Delta F/F_0)/\text{ms}$ , la duració a mitja altura dels esdeveniments (FDHM) és  $49.42 \pm 3.30$  ms i la constant de decaïment és  $73.03 \pm 10.38$  ms. Per últim, en el cas dels *sparks* d'experiments d'alta resolució s'ha obtingut un últim paràmetre que engloba a tots els anteriors i fa referència al volum de calci total alliberat per sobre del *baseline* local, aquest últim paràmetre és la massa del senyal de calci, que correspon a  $10.56 \pm 1.39$  a.u.. Les freqüència de *sparks* és de  $5.12 \cdot 10^{-6} \pm 0.13 \cdot 10^{-6}$  sparks/(ms· $\mu\text{m}^2$ ).

### 3.4.3 Caracterització d'esdeveniments de molt alta resolució temporal

La tècnica més extensa a l'hora de quantificar i caracteritzar els esdeveniments de calci en els miòcits cardíacs és LS, és una tècnica que et permet captar imatges a molt alta resolució temporal a costa de perdre la informació espacial. Tot i saber aquestes limitacions s'ha volgut observar quins efectes provoca en la fisiologia de les cèl·lules.

Comparant els paràmetres de les activacions dels RyR2 clústers de 57 cèl·lules ventriculars de 11 ratolins, es pot observar una clara tendència a una dinàmica més lenta i un augment en l'activitat. El canvi més rellevant que s'observa és una freqüència d'esdeveniments més elevada i un augment del nombre d'ones de calci en els experiments.

Aquests augments en l'alliberament de calci es reflecteixen en la morfologia dels esdeveniments on s'observa una disminució de l'amplitud juntament amb una velocitat més lenta de la ràtio d'elevació del calci (RoR). Això pot ser degut a que hi ha més radicals lliures, provocarà per la pròpia tècnica, aquests redueixen el llindar d'activació dels canals de RyR2s, i per tant, els *sparks* s'activen a nivells de calci luminal menors, donant lloc a esdeveniments de menor amplitud o bé a la disminució del contingut de calci en el reticle sarcoplasmàtic.

Per altra banda s'observa un augment en la duració dels esdeveniments i en la constant de decaïment dels mateixos, que pot indicar que s'activen més RyR2s d'un mateix canal. No s'ha observat canvis significatius en els valors dels paràmetres de les activacions utilitzant diferent nombre de píxels en la línia d'escaneig.

Taula 23. Comparativa entre les activacions de RyR2 clústers en imatges d'escaneig de línia (LS512, LS256) i de seqüències temporals de fotogrames (FS). Els paràmetres mostren la mitjana  $\pm$  S.E juntament amb el p-valor de la comparació del valor de l'escaneig de línia en qüestió amb el valor del mateix paràmetre en les seqüències de fotogrames.

ACTs.	Amplitud $\Delta F/F_0$	RoR $(\Delta F/F_0)/ms$	FDHM ms	Const. Decaïment ms
LS512x1	0.38 $\pm$ 0.05 ***	0.017 $\pm$ 0.002 ***	31.75 $\pm$ 2.79 *	53.87 $\pm$ 5.55 ***
LS256x1	0.36 $\pm$ 0.02 ***	0.017 $\pm$ 0.001 ***	30.09 $\pm$ 1.05 *	54.58 $\pm$ 2.06 ***
FS256x40	0.48 $\pm$ 0.03	0.025 $\pm$ 0.002	24.75 $\pm$ 2.58	28.31 $\pm$ 6.60

Taula 24. Taula resum de les freqüències dels esdeveniments en les cèl·lules on s'ha obtingut experiments de LS i FS.

ACTs.	Freq. Activacions #Activacions/(ms·RyRs)	Freq. Waves #waves/ms
LS512x1	14.9·10 <sup>-4</sup> $\pm$ 3.9·10 <sup>-4</sup> ***	0.70 $\pm$ 0.19 ***
LS256x1	19.31·10 <sup>-4</sup> $\pm$ 0.24 ·10 <sup>-4</sup> ***	0.81 $\pm$ 0.05 ***
FS256x40	0.11·10 <sup>-4</sup> $\pm$ 0.01·10 <sup>-4</sup>	0.09 $\pm$ 0.22

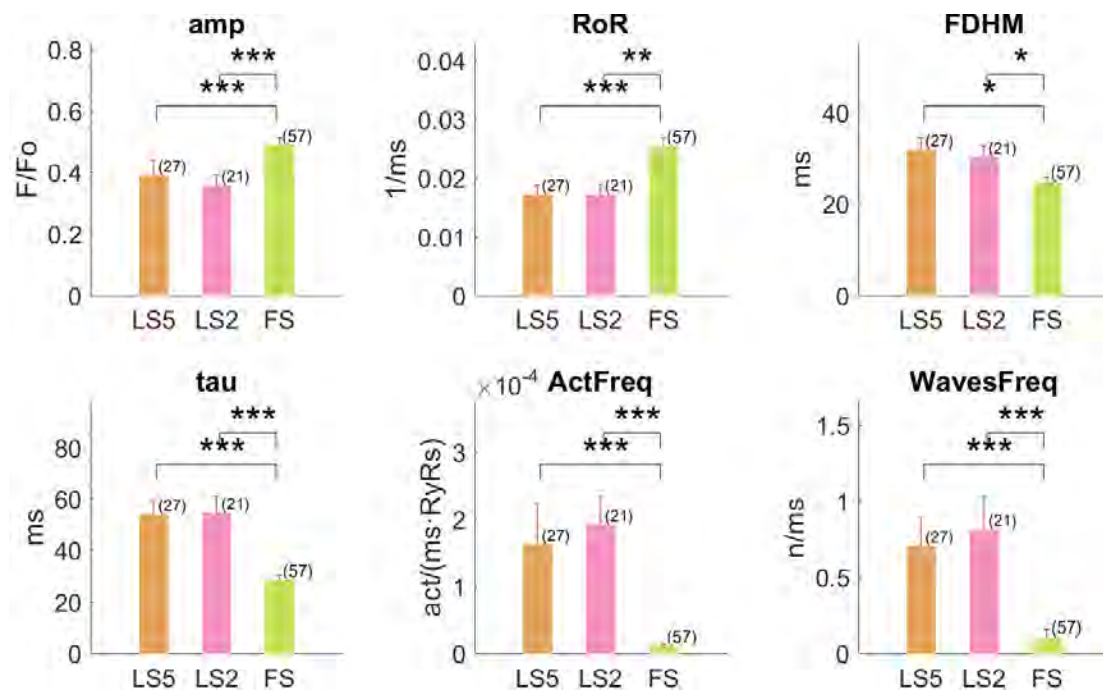


Figura 82. Paràmetres de la morfologia de les activacions en imatges de LS de 512x1 píxels (LS5) i 256x1 píxels (LS2) comparades amb imatges de FS de 256x40 píxels (FS) en les mateixes cèl·lules. Les barres representen la mitjana  $\pm$  S.E. i s'ha utilitzat el test de Wilcoxon per a la comparació entre poblacions.



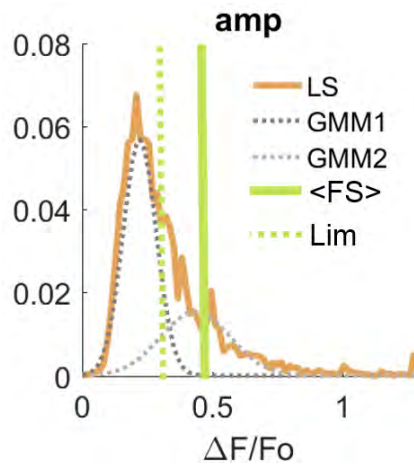


Figura 83. Histogrames de tots els valors d'amplitud de les activacions dels RyR2 clústers. En línies discontinües es mostren les dues distribucions d'activacions obtingudes mitjançant GMM. La distribució de l'esquerra (GMM1), que pren valors més petits, correspon a les activacions que queden amagades amb el soroll en les imatges de FS. La distribució de la dreta (GMM2), que pren valors més grans d'amplitud i FDHM, correspondria a les activacions de clústers de RyR2 que es visualitzen mitjançant la tècnica d'escanejat de fotogrames, s'ha marcat la mitjana de les cèl·lules de FS en verd <FS>.

Per mesurar els canvis fisiològics produïts pel *Line Scan* s'han retirat tots els esdeveniments per sota el llindar de la mitjana d'amplitud dels experiments de FS menys la desviació estàndard. Aquest llindar s'ha escollit per evitar falsa informació provinent d'activacions que es poden arribar a captar en LS però no en FS, que com s'ha esmentat permet captar esdeveniments més petits i de més curta durada degut a que els experiments de LS presenten menys soroll. Un cop aplicat el filtre, s'han obtingut els següents resultats:

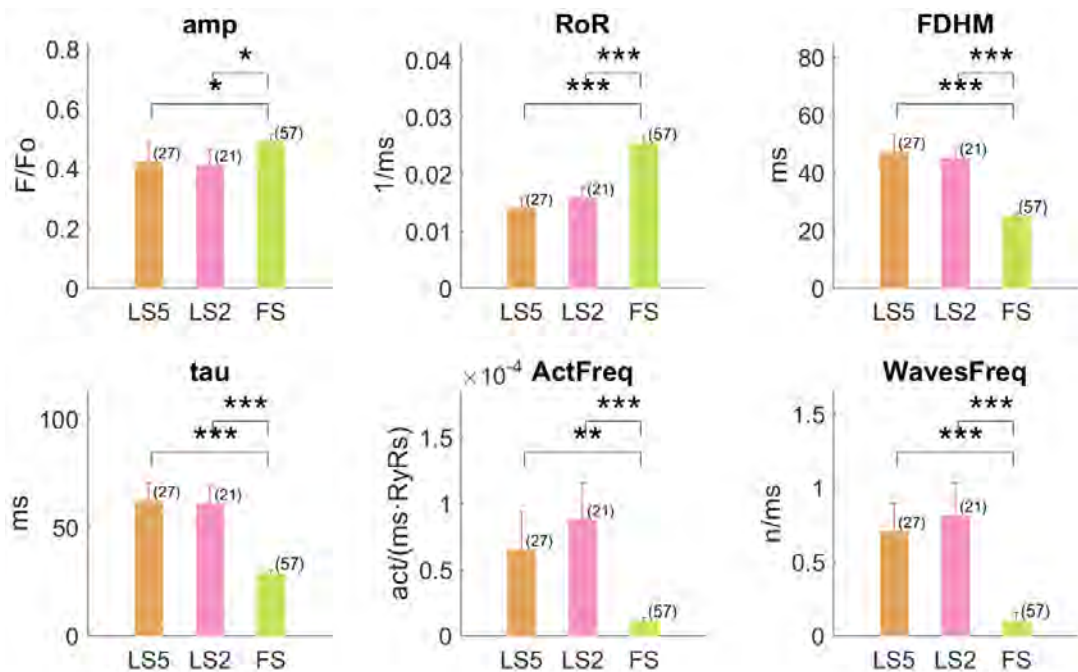


Figura 84. Paràmetres de la morfologia de les activacions aplicant el filtre de les activacions de FS en imatges de d'escaneig de línia temporals de 512x1 píxels (LS5) i 256x1 píxels (LS2) comparades amb imatges de seqüències temporals de fotogrames de 256x40 píxels (FS) en les mateixes cèl·lules.

Es pot comprovar que, tot i així, l'amplitud segueix essent més petita, la ràtio d'elevació del calci més lenta i la durada i la constant de decaïment dels esdeveniments són més llargues. Finalment s'observa un augment en la freqüència d'activacions i en el nombre de *waves*, fet que ens indica que és més nociu per a les cèl·lules.

Per corroborar aquest efecte causat per l'exposició de les cèl·lules al làser s'ha comparat els paràmetres dels *sparks* d'experiments de FS. Per a realitzar aquesta comparació s'ha observat les dades de plaques on s'hi ha realitzat imatges de LS i FS amb dades de plaques on únicament s'han registrat seqüències temporals de fotogrames. En aquesta comparació s'ha mesurat els paràmetres dels *sparks*, la fracció de *sparks* d'un, dos o tres RyR2 clústers i l'activitat global de calci.

S'ha observat que el nombre de *sparks* de dos clústers augmenta en les plaques en que s'ha realitzat experiments de LS ( $6.38 \pm 1.61\%$  vs  $10.89 \pm 1.66\%$ ,  $p = 0.03$ ), acompanyat d'una disminució del percentatge de *sparks* d'un sol clúster ( $91.80 \pm 0.02\%$  vs  $86.65 \pm 1.98\%$ ,  $p = 0.04$ ). El nombre de 3 RyR2 clúster *sparks* es manté tot i que el percentatge d'aquests esdeveniments és molt baix en comparació al total de *sparks* que es donen en les cèl·lules.

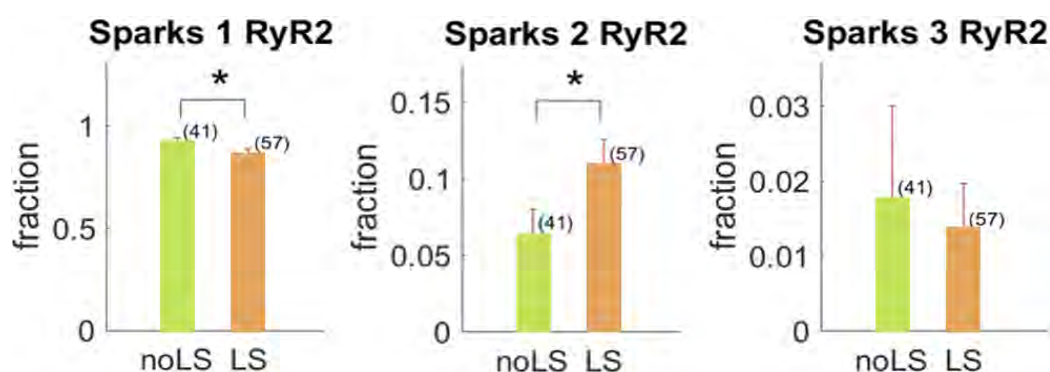


Figura 85. Fracció de *sparks* formats per un, dos i tres RyR2 clústers en experiments on no s'ha realitzat registres d'escaneig de línia (noLS) i experiments on si que s'ha realitzat registres d'escaneig de línia (LS).

Respecte a la morfologia dels esdeveniments s'ha observat un augment de la durada dels *sparks* ( $45.38 \pm 2.57$  ms vs  $69.77 \pm 4.12$  ms,  $p < 0.001$ ) presentant juntament una constant de decaïment més lenta ( $67.40 \pm 10.24$  ms vs  $83.74 \pm 7.18$  ms,  $p < 0.005$ ). Aquestes variacions acaben repercutint en el conjunt global de l'esdeveniment augmentant la massa de l'*spark* ( $9.57 \pm 1.10$  a.u. vs  $17.24 \pm 1.52$  a.u.,  $p < 0.001$ ). En conjunt també s'ha observat un augment de la freqüència de *waves* ( $7.99 \cdot 10^{-4} \pm 1.89 \cdot 10^{-4}$  vs  $13.00 \cdot 10^{-4} \pm 2.48 \cdot 10^{-4}$  *sparks*/(s· $\mu$ m),  $p < 0.001$ ) i una tendència a l'alça, però no estadísticament significativa, de la freqüència de *sparks* ( $0.75 \cdot 10^{-5} \pm 0.47 \cdot 10^{-5}$  vs  $4.52 \cdot 10^{-5} \pm 0.92 \cdot 10^{-5}$  *waves*/(s· $\mu$ m),  $p = 0.14$ ).

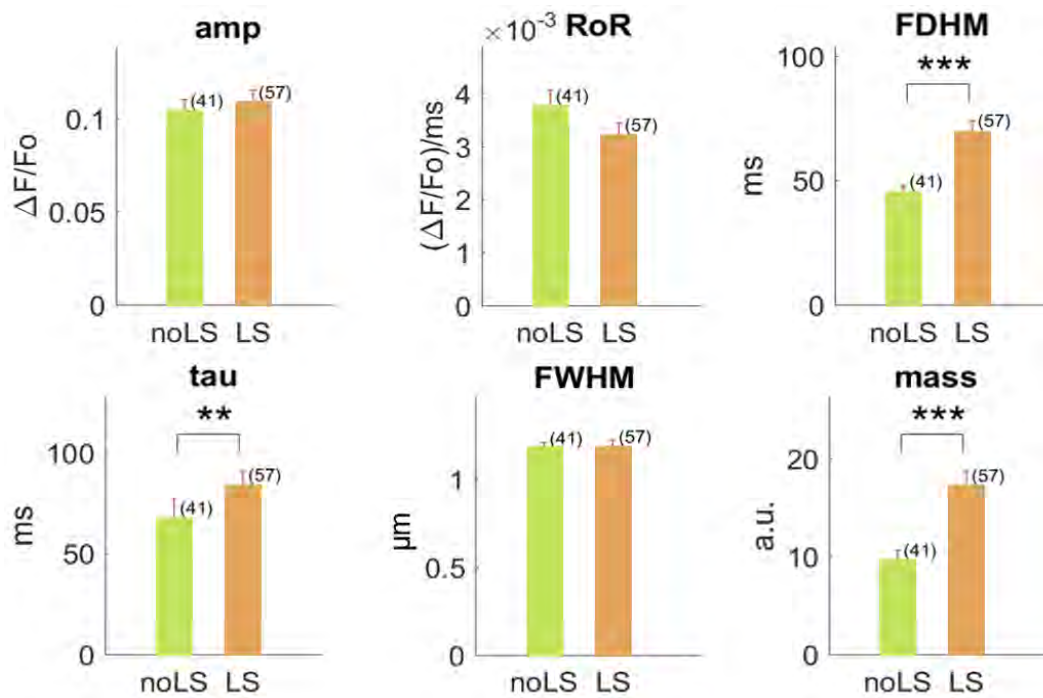


Figura 86. Paràmetres de la morfologia dels *sparks* dels experiments de plaques on no s'ha realitzat escaneig de línia (noLS) i experiments on si que hi ha hagut registres d'escaneig de línia (LS).

### 3.4.4 Validació detecció esdeveniments

El mètode dissenyat s'ha validat a partir d'imatges de models de cinètica del calci desenvolupats per Marchena i col·laboradors al 2018 [53][PC10]. Per simular les condicions experimentals primer s'ha obtingut la distribució espacial del soroll en les imatges obtingudes amb el microscopi. Aquests presenten un soroll electrònic característic del fotodetector. Un cop caracteritzat s'ha afegit diferents nivells de soroll a les imatges i s'ha estudiat l'efecte que provoca modificar el nivell d'intensitat pel filtratge d'esdeveniments.

En el món real i la natura les superfícies es presenten llises, per això canvis abruptes en la distribució dels valors de píxels s'anomenen soroll. Per a quantificar-ho s'ha mirat quants píxels corresponien a un pic de soroll respecte als veïns i s'ha mesurat la ràtio de píxels amb soroll respecte al nombre total de píxels per a cada fotograma. S'ha observat que la distribució de valors al llarg del registre segueixen una distribució gaussiana de mitja 0.10 i desviació estàndard de 0.0036, que correspon a -1.06 dB. Tot i així s'observa certa variabilitat en el soroll, la mitjana de les gaussianes varia de 0.06 fins a 0.15, i la desviació estàndard pren valors des de 0.0030 fins a 0.0045, és per aquest motiu que s'utilitzarà un rang de sorolls a l'hora de realitzar la validació.

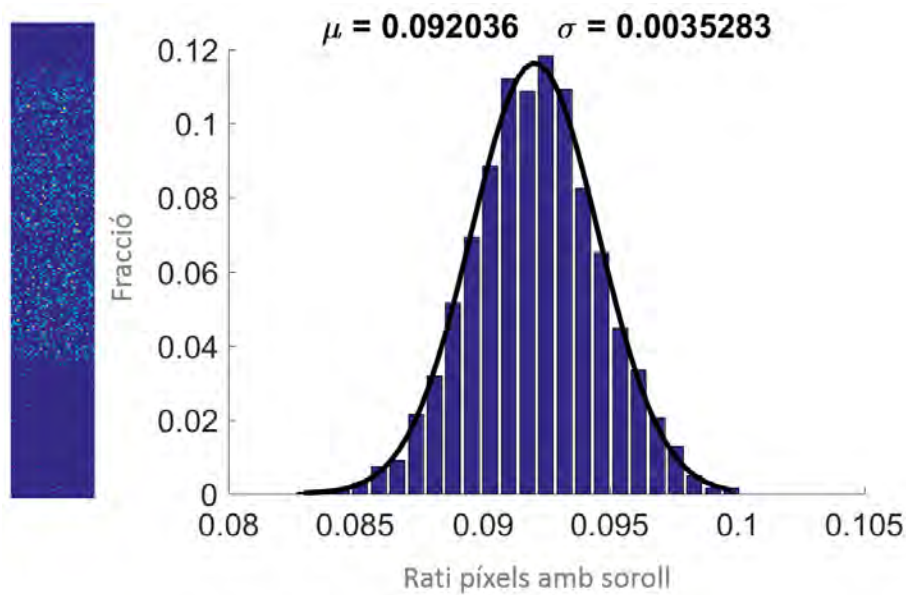


Figura 87. Exemple de caracterització del soroll espacial d'un registre. Al panell Esquerra s'observa un frame i al panel dret la distribució de les ràtios de soroll al llarg dels fotogrames del vídeo.

El model mostra molts rangs d'activitat, des d'una petita obertura de poc canals en un mateix clúster fins a *sparks* de diversos clústers. Per tant, es podrà avaluar quina fracció d'aquesta activitat petita no és possible detectar degut a les limitacions experimentals.

Els sorolls afegits corresponen a les següents distribucions:

Taula 25. Soroll afegit al model.

Soroll	Mitjana	Desviació estàndard	dB
$n_0$	-	-	$\infty$
$n_1$	0.04	0.0015	$14.28 \pm 0.05$
$n_2$	0.09	0.0030	$-11.09 \pm 0.08$
$n_3$	0.14	0.0045	$-26.66 \pm 0.07$
$n_4$	0.18	0.0060	$-36.08 \pm 0.08$

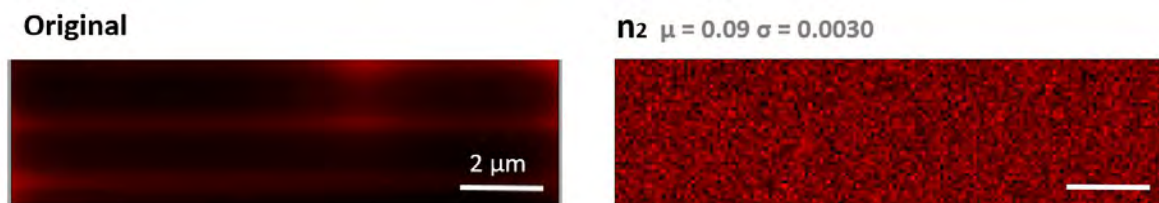


Figura 88. Exemple de fotograma del model original a l'esquerra juntament amb un fotograma amb soroll afegit a la dreta.

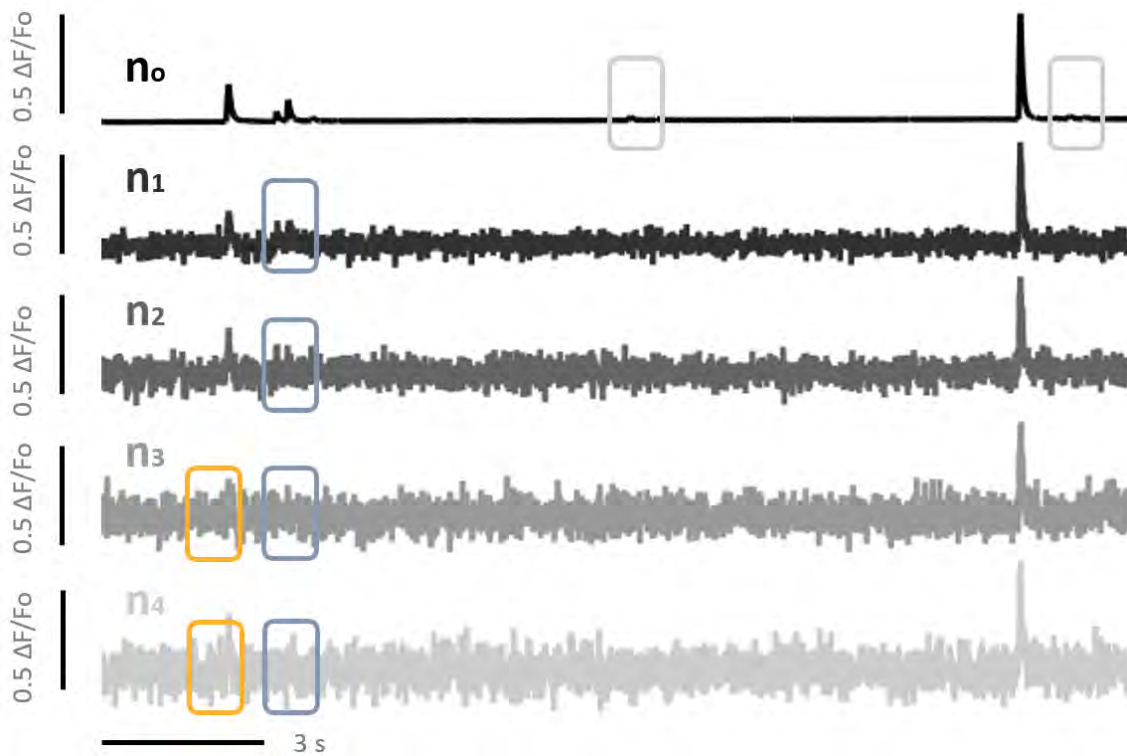


Figura 89. Senyal i soroll afegit. Es pot apreciar que al incloure soroll en les imatges produeix que alguns esdeveniments senyalitzats amb rectangles de colors desapareguin en augmentar el nivell de soroll.

Els paràmetres que s'han utilitzat per avaluar la detecció han estat la ràtio omissions i la ràtio de falsos positius.

$$R_{omi} = \frac{FN}{\#esdeveniments\ total} \quad (37)$$

$$R_{FP} = \frac{FP}{\#esdeveniments\ total} \quad (38)$$

On  $R_{omi}$  és la ràtio d'omissions, FN els falsos negatius i  $R_{FP}$  és la ràtio de Falsos Positius, FP el nombre de falsos positius.

El ventalls de factors que multipliquen el nivell de soroll del *baseline*,  $MAD(bl)$ , ha estat de 0 a 5. El llindar d'intensitat serà la multiplicació del factors pel soroll de l'estat basal dels senyals.

Els esdeveniments d'alliberament de calci produïts per la col·laboració de menys del 25% canals de RyRs d'un clúster no es tindran en compte en la validació ja que no són l'objectiu del programa i que queden dissimulats amb nivells de soroll inferiors als que s'observen en les dades experimentals (Fig. 89,  $n_0$  requadre gris).

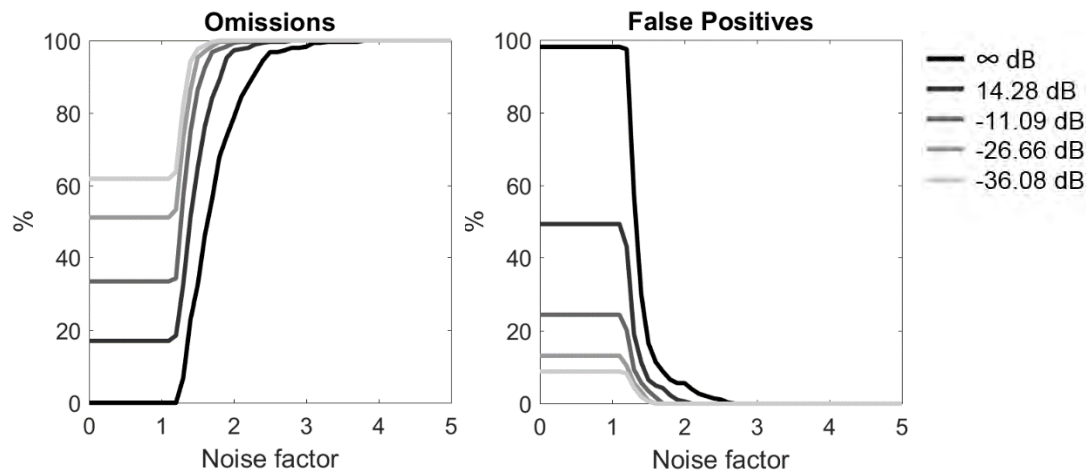


Figura 90. Ràtios de nombre d'omissions i nombre de falsos positius per a cada condició de soroll.

A mesura que augmenta el soroll, augmenta el nombre d'omissions d'esdeveniments. En les condicions de soroll similars a les observades en les dades experimentals, es pot observar que la ràtio d'omissions inicial és de 33.39%, i en condicions de soroll més elevat arriba a ser un 61.77%. Es pot observar l'efecte contrari amb el nombre de falsos positius: quan més soroll, menys falsos positius detecta el procediment. Aquest fet és degut a que amb menys condicions de soroll la difusió del calci és més nítida i pot donar lloc a falses deteccions. També mostra que el programa és robust a filtrar activitat petita provinent del soroll experimental. En condicions similars a les observades en els vídeos el nivell de falsos positius inicial és de 24.50%.

Una altra dada que es pot extreure d'aquesta validació és el factor de soroll ideal, que en tots els casos es situa entre 1 i dues vegades el soroll de l'estat basal del senyal. Aquesta dada ens indica que hi ha molta activitat de calci petita amb una amplitud menor del doble de la MAD del soroll. En el cas més similar a les dades experimentals el millor factor de soroll és 1.2 a l'hora de realitzar la detecció d'esdeveniments.

## 3.5 DISCUSSIÓ

---

### *Estudi dels RyR2 clústers i les seves propietats*

S'ha observat que el nombre de RyRs de les cèl·lules varia segons l'àrea d'aquestes i la distribució de densitats no és homogènia. La densitat de RyR2 clústers en la regió SL (0-75 nm distància de la membrana) és lleugerament superior que en el centre de la cèl·lula (225 nm fins a l'interior). Aquest increment de densitat en la membrana es veu reforçat amb l'estudi de la distància entre els RyRs veïns més propers la qual és més petita en el SL 0.66  $\mu\text{m}$  en MVM i 0.80  $\mu\text{m}$  en cèl·lules de HAM.

La distància entre RyRs y línies Z concorden amb el descrit prèviament en la literatura. En el treball de Chen-Izu i col·laboradors [25] on es descriuen distàncies transversals similars en MVM i HAM, tant en la regió SL (1.05 i 0.97  $\mu\text{m}$ , respectivament) com en la regió CC (1.87  $\mu\text{m}$  i 1.69  $\mu\text{m}$ , respectivament). Per altra banda, a l'estudi de Galice i col·laboradors al 2018, realitzat amb cèl·lules de rata [106] troben distàncies transversals (0.75  $\mu\text{m}$ ) i longitudinals (1.65  $\mu\text{m}$ ) lleugerament més curtes de el que s'ha observat en el present treball. En general les distàncies es situen entre 1.00  $\mu\text{m}$  i 1.70  $\mu\text{m}$  i les petites variacions de 100-200 nm que es poden observar podrien ser degudes a la preparació o l'estat de les cèl·lules, si estan més contretes les distàncies seran més curtes.

Tant les imatges d'immunofluorescència com les imatges d'acumulació de fotogrames del canal de RyRs no mostren un soroll molt elevat. La validació del programa mostra que al augmentar el nivell de soroll de les imatges s'ha d'escollir un nivell d'intensitat més elevat per compensar aquest augment d'artefactes. En situacions similars a les dades experimentals i utilitzant el llinard òptim, la ràtio d'omissions va des del 8% fins al 20% i la de falsos positius del 0% al 20%.

### *Activitat espontània de calci en el sarcolemma i el centre de la cèl·lula*

En MVM, no s'observen diferències significatives entre la morfologia dels sparks que tenen lloc en la membrana cel·lular i els que tenen lloc a l'interior de la cèl·lula. Això pot atribuir a que el ventricle, a diferència de l'aurícula, té túbuls T que promouen la distribució homogènia del calci en tota la superfície de la cèl·lula, inclús en l'interior.

### *Activitat espontània de calci en miòcits d'aurícula dreta i esquerra*

Les imatges de cèl·lules dels miòcits de ambdues aurícules no mostren diferències significatives ni en la morfologia de les activacions ni en els paràmetres dels *sparks*. El nombre de RyRs activats en els *sparks* no mostra diferències significatives. Les freqüències d'activacions, *sparks* o *waves* de calci es presenten lleugerament diferents però sense arribar a ser estadísticament significatives. També el volum d'esdeveniments tipus *wave* pot modular el resultat ja que quan ocorren no permeten que

aparegui activitat espontània de més curta durada, el SR queda més buit i hi ha un temps de latència fins que aquest no recull el calci que ha quedat lliure al citosol.

#### *Activitat espontània dels clústers de RyR2 en cèl·lules ventriculars*

S'ha observat que un 91% dels *sparks* provenen d'activacions d'un sol clúster de RyR2, un 8% de dos RyR2 clústers i un 0.53% de tres RyR2 clústers, per tant la majoria de l'activitat de calci espontània localitzada de les cèl·lules de control prové de obertura d'un sol clúster. L'elevada resolució temporal ha permès quantificar que el temps que tarda en activar-se el segon clúster, que és de 9.98 ms. També s'ha vist que el 85% dels *sparks* de dos RyRs tenen lloc en la mateixa línia Z i el 15% restant salten a la línia Z veïna. Les distàncies entre parelles de clústers activats en un mateix *spark* coincideixen amb les distàncies de RyRs veïns més propers observades en les imatges de immunofluorescència, tant la DNN com la transversal entre línies Z.

#### *Comparativa de l'activitat de calci entre cèl·lules auriculars i ventriculars de ratolí*

Les diferències observades en l'activitat del calci entre MAM y MVM no es poden atribuir a diferències fisiològiques, ja que hi ha discrepàncies en les condicions experimentals: (I) Els MAM es van analitzar a una temperatura ambient de 25°C i els MVM a temperatura fisiològica de 37°C. Prèviament s'ha relacionat la disminució de la temperatura amb un augment de l'activitat [118]. (II) Les potències dels làsers eren més elevades en els experiments de cèl·lules auriculars que en les ventriculars, fet que promou l'augment de residus ROS que ha estat prèviament relacionat amb cardiopaties [119]-[121]. (III) La resolució temporal va ser més baixa en MAM que en MVM.

Aquests dos canvis en el disseny experimental contribueixen a que hi hagi un augment en la freqüència de *waves* en MAM respecte MVM, que mostren una freqüència de *sparks* més elevada. També es poden observar en diferències en la morfologia dels senyals, en el cas de les activacions s'observen amplituds més elevades en els MVM però per altra banda en MAM s'observa una durada més llarga, fet que també pot ser degut a la resolució temporal, que és més baixa en aquest cas. La constant de decaïment del calci també es presenta més elevada en les cèl·lules auriculars. En el cas dels *sparks* s'observa que la duració és quasi el doble en els MAM respecte als MVM i la constant de decaïment també es significativament més llarga.

Totes aquestes modificacions en l'activitat no es poden atribuir a diferències fisiològiques de les cèl·lules a causa de les discrepàncies entre els dissenys experimentals. Tot i així l'augment en la freqüència de *waves* en les cèl·lules auriculars podria ser degut a l'augment de la potència del làser.



### *Comparativa dels mètodes d'obtenció d'imatges d'alta resolució temporal*

Tant la tècnica de registre temporal de fotogrames (FS) com amb la tècnica d'escanejat de línia (LS) s'ha obtingut una resolució temporal adequada com per discernir quin RyR2 clúster s'activa primer en els *sparks* on hi participen més d'un clúster. La principal diferència és que amb la tècnica de LS només es pot tenir informació d'una línia Z, perdent la informació de les línies Z contigües, però obtenint una millor informació temporal que permet estudiar més clarament la morfologia dels esdeveniments.

Gràcies a l'alta resolució temporal que proporciona la tècnica LS es poden detectar esdeveniments de menor amplitud i curta durada que en les seqüències temporals de fotogrames, ja que en aquestes últimes queden amagats en la línia temporal, degut a la presència de soroll i a la captació de menys mostres temporals.

Tant l'exploració visual com l'obtenció de paràmetres morfològics dels esdeveniments que canviar la modificació de la resolució espacial de l'escanejat de línia no mostra diferències estadísticament significatives. On si es mostren diferències és al comparar les característiques obtingudes amb LS i FS de les mateixes cèl·lules: (I) l'amplitud dels experiments de LS disminueix de mitjana un 25% ( $p < 0.001$ ), el RoR disminueix un 30% ( $p < 0.01$ ), la durada augmenta un 25% ( $p < 0.05$ ) i la constant de decaïment un 90% ( $p < 0.001$ ), respecte als valors dels paràmetres de morfologia de les activacions del experiments de FS. També s'observen uns valors més elevats de les freqüències de *sparks* ( $p < 0.001$ ) i de *waves* ( $p < 0.001$ ) en els experiments de LS. Tot i tenir en compte que es poden detectar més esdeveniments emprant la tècnica de LS, aquest augment en la durada, la constant de decaïment i el nombre de *waves* ens pot indicar que les cèl·lules estan menys sanes. Això potser degut a l'exposició continuada del làser amb la tècnica de LS, que mantinguda en un punt de la cèl·lula pot desencadenar la producció d'ATP en les mitocondries, conduint a un augment en la producció d'espècies reactives a l'oxigen i d'òxid nítric. Per tant, un cop absorbida l'energia del làser, es poden observar canvis com ara provocar l'acceleració de la transferència d'electrons durant la respiració cel·lular o alteració en les propietats redox. L'escalfament localitzat dels cromòfors poden induir canvis bioquímics: augment en la producció de  $O_2$  i espècies de oxigen amb radicals lliures. Aquest canvis en la fisiologia de la cèl·lula poden acabar desencadenant l'apoptosi de la mateixa [119]–[123]. Els radicals lliures dintre de la cèl·lula poden provocar que els RyR2 s'activin amb més facilitat, el calci luminal necessari per a l'activació és menor i per aquest motiu se n'observen més *sparks* i de menor amplitud. Aquest augment d'activacions també pot provocar que es buidi molt ràpid el reticle sarcoplasmàtic i, per tant, hi hagi menys calci a l'abast per alliberar. Al disminuir el calci luminal d'activació també provoca que els RyR2s s'activin amb més facilitat, fet que s'observa amb l'augment del FDHM i la constant de decaïment, ja que hi ha més canals d'un mateix clúster alliberant calci.

Per reforçar aquesta hipòtesi s'han comparat els resultats dels paràmetres dels *sparks* de registres de FS en plaques on s'ha realitzat registres de LS i en plaques on no s'hi ha realitzat registres de LS. En el cas de les plaques on s'hi ha realitzar registres de LS l'amplitud i el RoR no varien però si veiem un augment del 50% en la durada dels esdeveniments ( $p < 0.001$ ), la constant de decaïment és un 25%

més gran ( $p < 0.01$ ) i en la massa dels *sparks* és un 80% més gran ( $p < 0.001$ ). Globalment també s'observa un augment en la freqüència dels *sparks* ( $p < 0.001$ ). Aquestes variacions promouen a que en les plaques on s'hi ha registrat LS s'observin més *sparks* de múltiples clústers ( $p < 0.01$ ). Tots aquests factors corroboren la hipòtesis de que l'augment del temps d'exposició de les cèl·lules al làser en LS promou dinàmiques del calci similars a les observades en experiments de cèl·lules amb fisiologia anormal.

Les dues tècniques són aptes per estudiar esdeveniments amb alta resolució temporal, i per tant, l'elecció d'una o l'altra dependrà de les característiques que es volen estudiar (Taula 26). Tot i així és important tenir en compte els canvis que promou LS en la fisiologia de les cèl·lules.

Taula 26. Taula resum de les característiques de les tècniques d'obtenció d'imatges.

	<i>FS</i> 256 x 40	<i>LS</i>
Dinàmica del calci ( <i>STIMs, waves...</i> )	✓	✓
Obs. De <i>sparks</i>	✓	✓
Obs. $\Delta t$ entre activacions de RyRs	↑	↑↑
Obs. Subactivacions del mateix clúster	↓	↑
Obs. Trajectòries (x,y)	↑	↓
Suavitzat del senyal	↑	↓
Citotoxicitat	↓	↑

#### *Rendiment del mètode proposat per la detecció*

Les imatges experimentals presenten un soroll electrònic característic amb una distribució espacial de soroll que correspon a una gaussiana amb una mitja de 0.10 i una desviació estàndard de 0.0037. S'ha aplicat un rang de nivells de soroll entorn a aquesta distribució a imatges de models sintètics d'activitat de calci per validar el mètode de detecció.

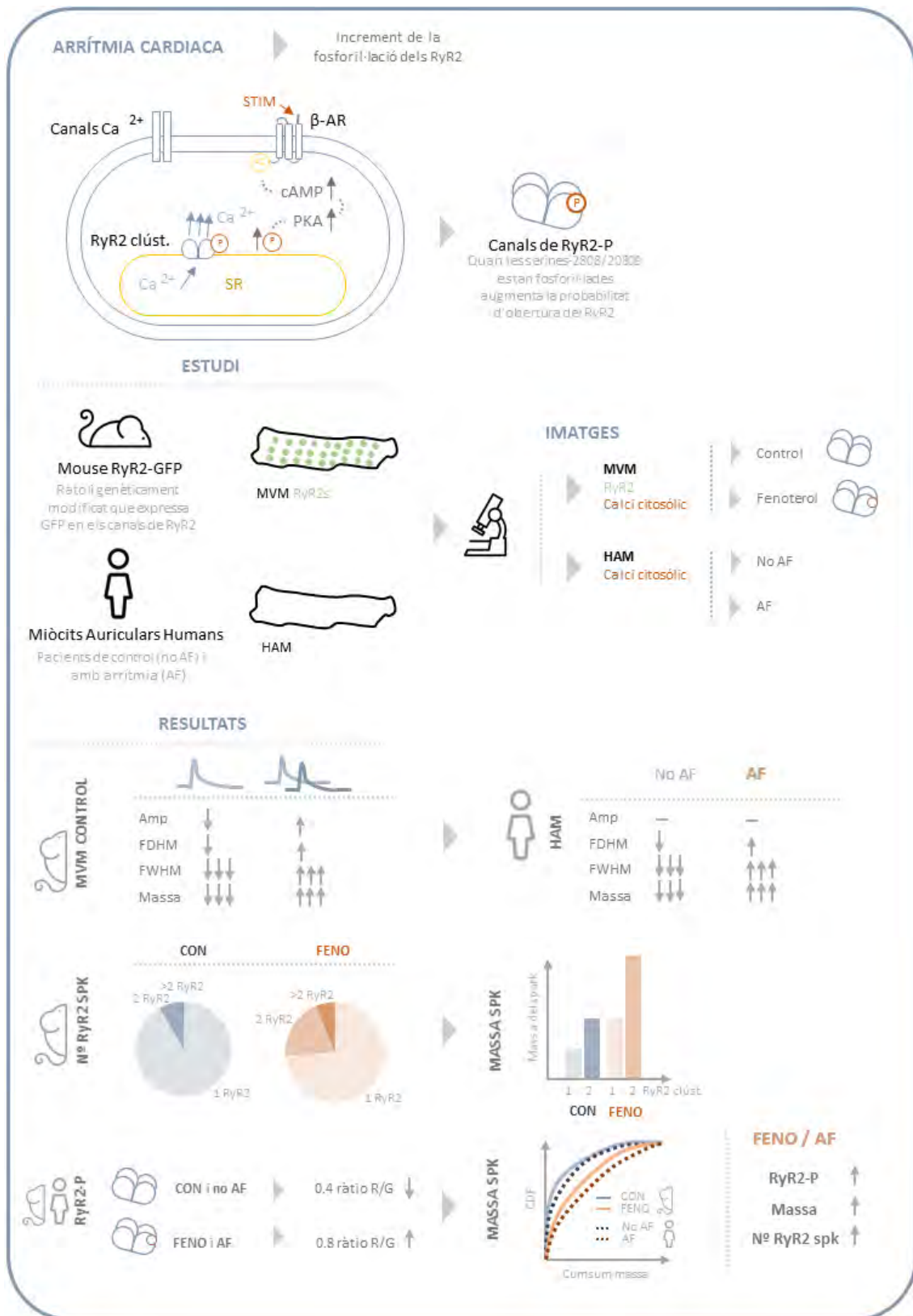
S'ha observat que en el cas ideal, sense soroll, el programa no és capaç de detectar el 35.34% dels esdeveniments, que representen el conjunt d'esdeveniments produïts per l'activació de menys del 25% dels canals del clúster. Si no es tenen en compte aquestes omissions, el mètode en condicions ideals té un 0.00% d'omissions, per tant detecta tots els esdeveniments que es presenten en les imatges.

Quan s'afegeix soroll gaussià amb les mateixes característiques que en les imatges experimentals i utilitzant el factor de soroll òptim, el mètode assoleix una ràtio d'omissions del 33.39% i un 24.50% de ràtio de falsos positius. Aquesta ràtio d'omissions pot semblar elevada, però veient els resultats en el cas ideal només reflexa el percentatge d'esdeveniments que queden difuminats degut al soroll de les imatges. El percentatge de falsos positius és degut a la detecció de la difusió de calci de l'*spark* com a esdeveniment pròpiament, s'observa poques vegades que es detecti un pic de soroll ja que utilitzant el suport temporal *wavelet* adequat s'eviten aquests falsos positius. S'ha observat que aplicant un factor del soroll superior a 3 es perd tota la informació del que està succeint en la cèl·lula. El factor de soroll ideal és de 1.2.

# CAPÍTOL 4

## **MORFOGÈNESIS D'ESDEVENIMENTS DE CALCI EN CASOS D'ARRÍTMIA CARDÍACA**

# ABSTRACT GRÀFIC



L'arrítmia cardíaca ha estat associada amb una densitat de *sparks* elevada i una durada de alliberament espontani de calci més llarga, que dona lloc a despolaritzacions de les cèl·lules [124] capaces d'induir patrons d'activitat irregular i arrítmia. La fosforilació dels RyR2 en les serines s2808 i s2814 augmenta la probabilitat d'obertura del canal, que promou la fusió de *sparks* en *waves* de calci. Aquests esdeveniments de curta durada tenen lloc quan diversos canals de RyR2s de dintre un clúster s'obren de forma coordinada. Les propietats de l'*spark* i la seva habilitat d'induir l'alliberament de calci a més clústers veïns s'espera que depengui del nombre de RyR2 del clúster i la fracció d'aquests que s'obren. El potencial de propagació d'un *spark* també dependrà del nombre de RyR2 clústers que contribueixen en l'esdeveniment. S'han realitzat diferents classificacions d'aquesta activitat de calci que no es propaga però fins al moment no s'ha inserit en la relació de l'activació de RyR2 clústers individuals, la formació local de esdeveniments de calci i el seu potencial de propagació i despolarització de cèl·lules veïnes. Es per aquest motiu que l'objectiu d'aquest estudi és buscar la relació entre les activacions individuals de RyR2 clústers en els ratolins transgènics que presenten GFP en els RyR2. També s'ha volgut explorar com l'estimulació dels canals beta-adrenèrgics ( $\beta$ -AR) afecta a l'alliberament de calci de RyR2 clústers individuals i la seva habilitat de reproduir els canvis patològics que s'observen en miòcits auriculars de pacients amb fibril·lació.

## 4.1 MATERIALS I MÈTODES

---

Per a realitzar aquest estudi s'ha usat imatges de diverses modalitats de microscopia confocal, a l'hora de quantificar la fosforilació en els RyR2s s'ha emprat imatges immunofluorescència estàtiques i per a quantificar la dinàmica del calci s'ha obtingut imatges amb una evolució temporal (FS). També s'ha estudiat imatges de diferents espècies, en aquest cas humans i ratolins, l'objectiu és inferir amb les dades dels ratolins modificats genèticament (RyR2-GFP) el comportament que s'observa en les cèl·lules humanes en casos normals i d'arrítmia.

### 4.1.1 Preparació dels miòcits i adquisició de les imatges

Les cèl·lules auriculars humanes (HAM) han estat obtingudes a partir de 39 pacients sotmesos a operacions del cor amb cateterisme. Cada pacient va donar consentiment per escrit per obtenir una mostra de teixit que en condicions generals es descarta durant la intervenció. Un cop realitzada l'excisió de teixit, aquest ha estat dividit en petits trossos per a aïllar les cèl·lules amb una digestió enzimàtica. Per a la visualització del calci citosòlic les cèl·lules han estat carregades amb 2.5  $\mu$ M de fluo-4 AM. El fluoròfor ha estat excitat a 488 nm i l'emissió ha estat recollida entre 500 i 650 nm utilitzant el detector híbrid de Leica (HyD). L'atenuació del làser s'ha fixat al 4%. Les dimensions de les imatges són de 512x140 píxels durant 29.04 s, obtenint 2497 fotogrames de 0.28x0.28  $\mu$ m de resolució espacial i 11.63 ms temporal. El procediment ha estat realitzats a temperatura ambient.

Les cèl·lules de miòcits ventriculars de ratolí (MVM) han estat aïllades emprant la perfusió Langendorf del cor sencer amb una solució enzimàtica. Només s'han escollit els miòcits amb estriacions clares i elongats. La dimensió de les imatges s'ha reduït a 40x256 píxels per obtenir el millor compromís entre la resolució espacial i temporal, en aquest cas de 0.1x0.1 µm i 4.16 ms. La fluorescència GFP ha estat excitada a 488 nm amb el làser d'Argó, que ha estat atenuat al 15% i l'emissió ha estat recollida entre 480 i 580 nm amb el tub fotomultiplicador de Leica (PMT). El Rhod-2 ha estat excitat amb el làser de HeNe a 543 nm amb una atenuació del 8%, l'emissió ha estat recollida entre 560 i 700 nm amb el detector híbrid de Leica. Durant el procés les cèl·lules han estat a 37°C de temperatura.

Les imatges d'immunologia s'han obtingut a partir de cèl·lules de ratolins genèticament modificats obtenint en el canal verd de la fluorescència verd les localitzacions dels RyR2s-GFP, l'avantatge d'aquest marcatge dels receptors és que és genètic i, per tant, és més fiable que un marcatge amb immunofluorescència ja que mostra de manera real on estan localitzats els receptors. En el canal vermell s'ha marcat amb immunofluorescència la serines s2808 o s2814, que són els principals llocs de fosforilació. D'aquesta forma es pot estudiar com varia el grau de fosforilació aplicant el fàrmac d'estimulació dels receptors β-adrenèrgics, fenoterol 3 µM (FENO). Per obtenir aquestes imatges s'han aïllat els miòcits ventriculars de ratolí i s'han fixat amb paraformaldehide durant 5 minuts a temperatura ambient. Posteriorment les cèl·lules han estat marcades amb immunofluorescència amb anticossos primaris de anti-RyR2 i secundari anti-ser2808-P o anti-ser2814-P de conill. Després d'haver estat marcades s'han rentat i s'han guardat a 4°C fins al moment de l'adquisició d'imatges.

#### 4.1.2 Processament de les imatges

Un cop obtingudes de imatges s'han exportat utilitzant la llibreria de Bio-Formats [115]. S'ha usat dos mètodes de detecció dels esdeveniments diferents, ja que en el cas de les imatges de miòcits auriculars d'humà no es presenten els RyR2 marcats amb GFP.

La detecció ha seguit els següents passos, que difereixen entre els dos tipus de cèl·lules per la manca de RyR2-GFP en les cèl·lules humanes:

1. Detecció dels RyR2 i extracció del senyal temporal de calci de cada un d'ells (MVM).
2. Detecció dels esdeveniments de calci dels senyals i les seves característiques (MVM).
3. Agrupament d'activacions de RyR2s en *sparks* (MVM).
4. A partir de les seqüències d'imatges, detecció dels esdeveniments tipus *spark* (HAM)
5. Caracterització d'*sparks* individuals (MVM i HAM)

## 4.2 RESULTATS

### 4.2.1 Massa dels esdeveniments i agrupament dels senyals de calci de RyRs

Per establir una relació entre l'activació individual de RyR2s i els *sparks* s'han analitzat 3335 RyR2 clústers de 64 cèl·lules de 16 ratolins. En la figura 91 es pot visualitzar la relació entre els senyals de RyR2 clústers individuals (ROI de 0.5x0.5  $\mu\text{m}$ ) i els *sparks* finals (ROI 4x4  $\mu\text{m}$ ).

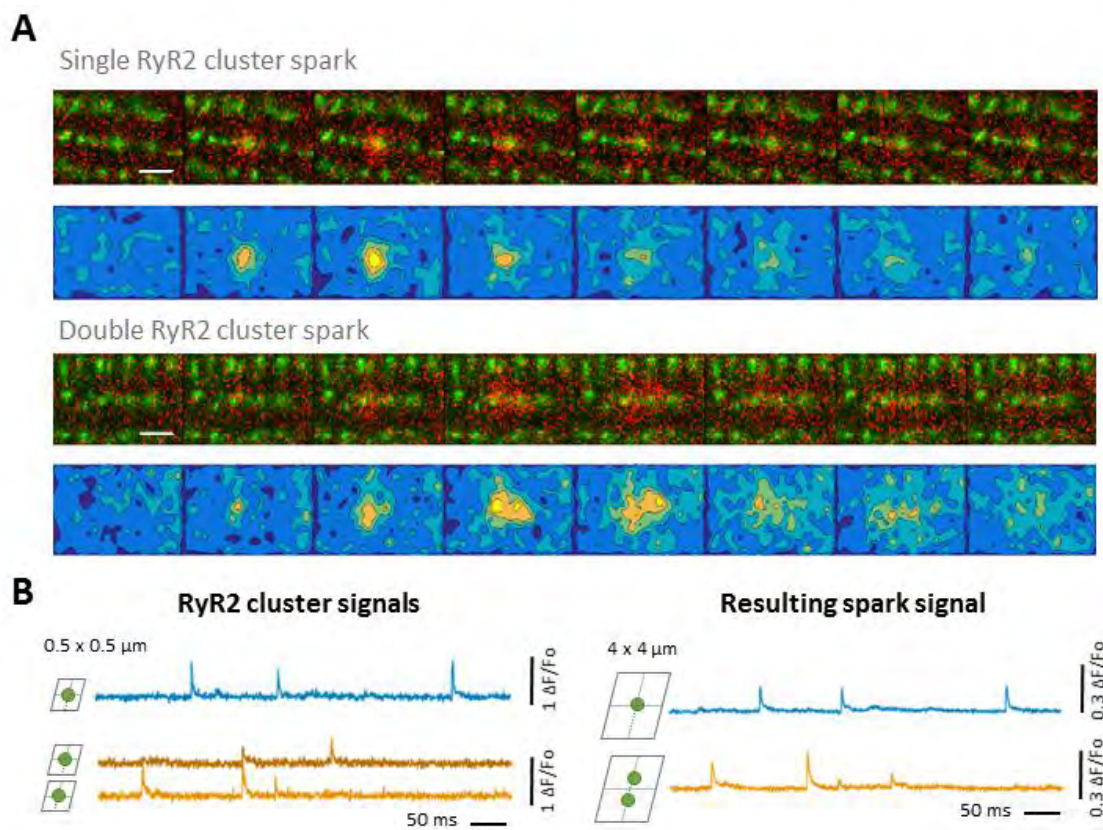


Figura 91. A) Imatges de *sparks* d'un i dos RyR2 clústers. B) Exemple de com es passa d'activacions de clústers individuals a senyals de *sparks* [P01].

De tots els clústers 228 dels 3335 han estat activats almenys un cop. Produint 467 *sparks* amb la intervenció d'un sol clúster, el  $91.4 \pm 2.0$  % dels *sparks*, 53 de dos clústers,  $8.0 \pm 1.6$ %, només s'han observat 11 *sparks* provinents de 3 RyR2 clústers. D'aquests 53 *sparks* de dos RyR2s, el 84.9 % s'han donat en una mateixa línia Z, per tant per parelles de RyR2s veïns, i un 15.1 % han estat coactivacions de RyR2s de diferents línies Z. Les distàncies entre els clústers de la mateixa línia Z són  $0.78 \pm 0.03$   $\mu\text{m}$  i  $1.88 \pm 0.06$   $\mu\text{m}$  En línies Z diferents (Fig. 93). El segon RyR2 s'ha vist que tarda de mitjana  $8.98 \pm 0.39$  ms en coactivar-se.

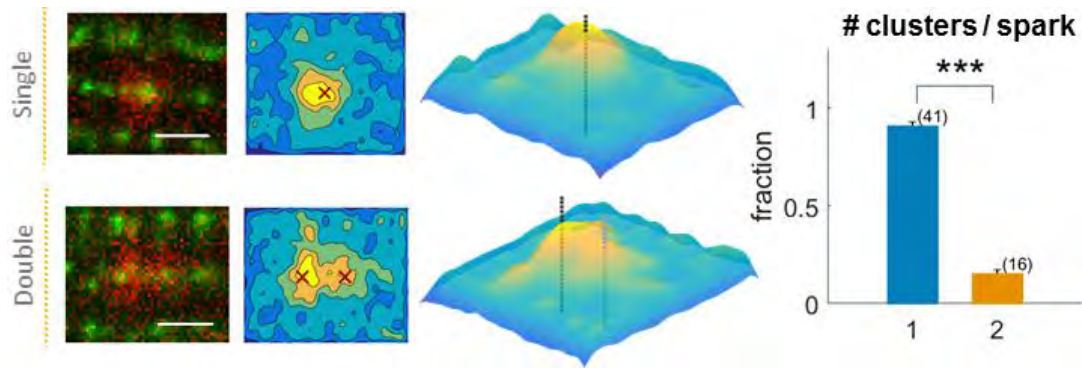


Figura 92. *Sparks* de calci en l'estat basal de la cèl·lula són causats per l'activació d'un o dos RyR2s clústers.

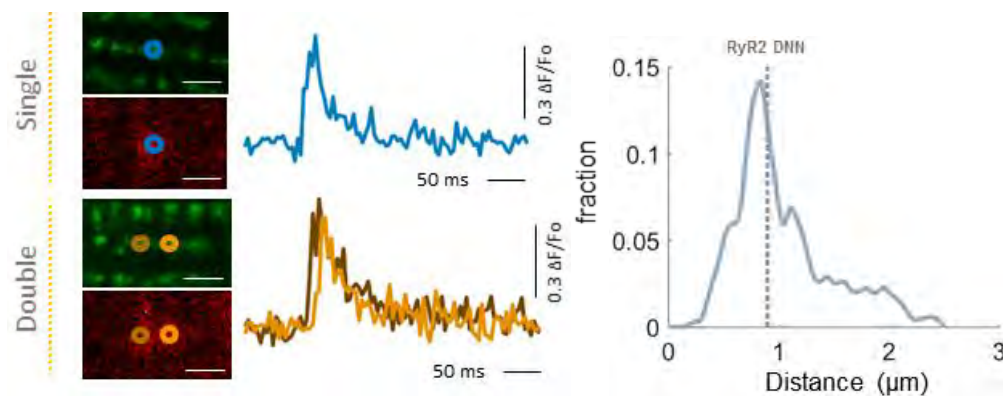


Figura 93. Distribució de la distància als RyR2 clústers veïns coactivats.

Les propietats cinètiques i espacials dels *sparks* d'un sol clúster o de dos clústers s'ha observat que els *sparks* de dobles clústers són més amples que en els *sparks* d'un sol clúster (Fig. 94 A-D). També tenen una durada més llarga (Figura 94 E-F). A més a més, s'han vist diferències significants entre les amplituds (Figura 94 G-H). No s'han observat diferències significants entre la ràtio d'elevació del calci (RoR)  $3.6 \pm 0.3$  ( $\Delta F/F_0$ )/ $\mu\text{s}$  versus  $4.0 \pm 0.6$  ( $\Delta F/F_0$ )/ $\mu\text{s}$  ( $p=0.50$ ), ni en el decaïment del calci, prenent valors de  $67.06 \pm 10.12$  ms per als *sparks* d'un sol clúster i  $74.20 \pm 7.15$  ms per *sparks* de dos clústers ( $p=0.07$ ). Observant les variacions entre l'activitat cinètica dels *sparks* d'una mateixa ROI s'ha vist que no hi ha diferències significatives entre en l'amplitud, l'amplada i la durada dels *sparks* de calci d'un o dos clústers (Figura 95). A més a més, la freqüència de les ROIs que produïen *sparks* d'un clúster i les ROIs on s'hi ha donat a lloc *sparks* de dos RyR2 no mostren diferències en la freqüència dels *sparks*.



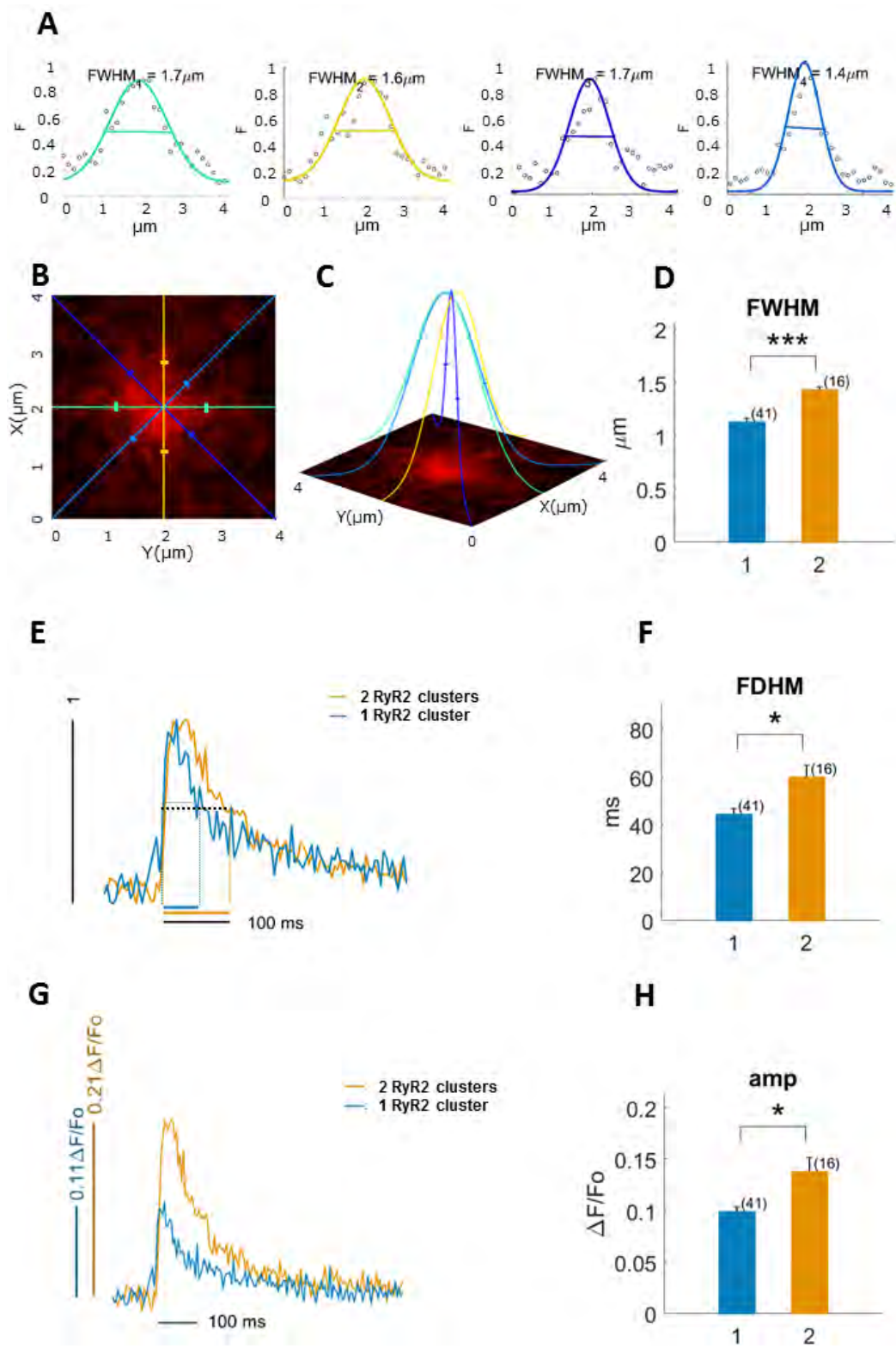


Figura 94. Sparks de calci causats per l'activació de dos clústers són més amplis, lents i grans [P01]

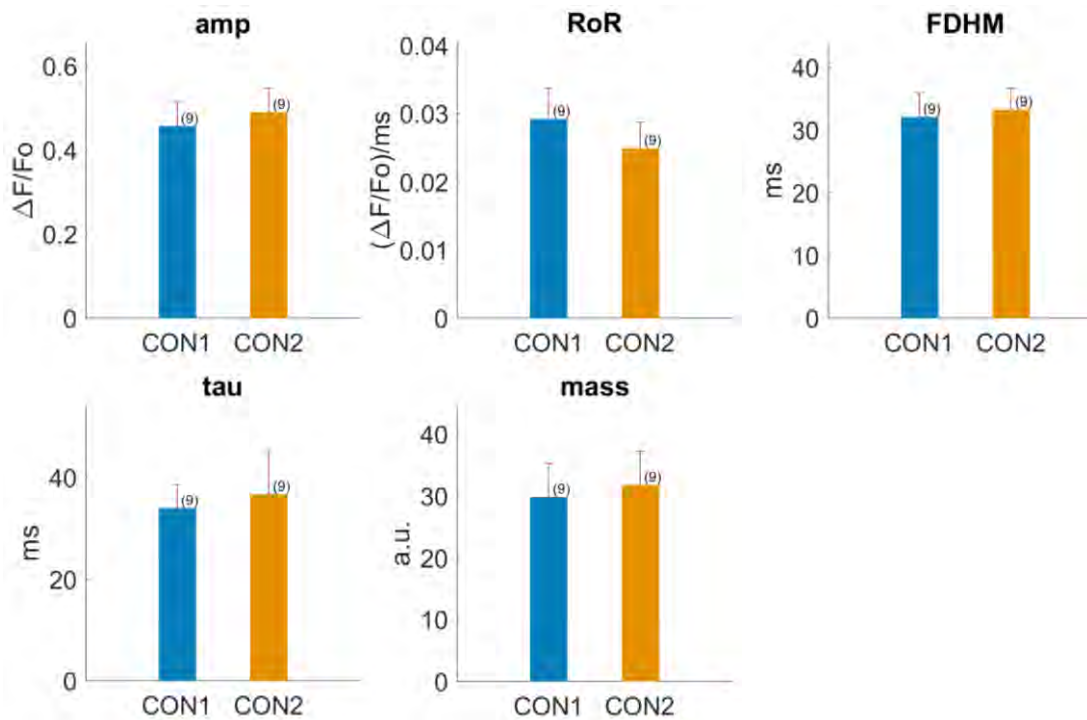


Figura 95. Paràmetres morfològics de les activacions d'un i dos RyR2 clústers, no s'observen diferències significatives.

L'habilitat de que l'alliberament d'un RyR2 clúster produeixi l'activació del RyR2 clúster veí es tindrà en compte com a potencial arritmogènic. La activació del RyR2 clúster veí pot ser produïda per les variacions en els paràmetres de la cinètica dels *sparks* observats. És per aquest motiu que s'ha realitzat la integral de l'*spark*, per tal d'englobar-los i obtenir la massa de l'*spark*, que es tindrà en compte com a indicador arritmogènic (Fig. 96A). En la Figura 96B es mostra que la massa d'un *spark* d'un sol RyR2 clúster és  $9.09 \pm 0.99$  a.u. en canvi per a un *spark* format per l'alliberació de dos RyR2 clústers és de  $16.89 \pm 3.37$  a.u. ( $p < 0.01$ ). En la Figura 96C es mostra la funció de distribució de probabilitat dels *sparks* d'un o dos RyR2 clústers i en la Figura 96D es mostra la funció de distribució acumulativa dels mateixos *sparks*. En l'anàlisi dels *sparks* en les ROIs que han tingut esdeveniments d'un i de dos clústers no s'observa una diferència significant de la massa en les activacions dels RyR2 activacions d'un segon clúster, cosa que ens indica que la coactivació no és proporcional a la quantitat de calci alliberada, però probablement depengui de la proximitat dels clústers o del llindar del segon clúster per l'alliberació de calci induïda per la sobrecàrrega del SR (SOICR).

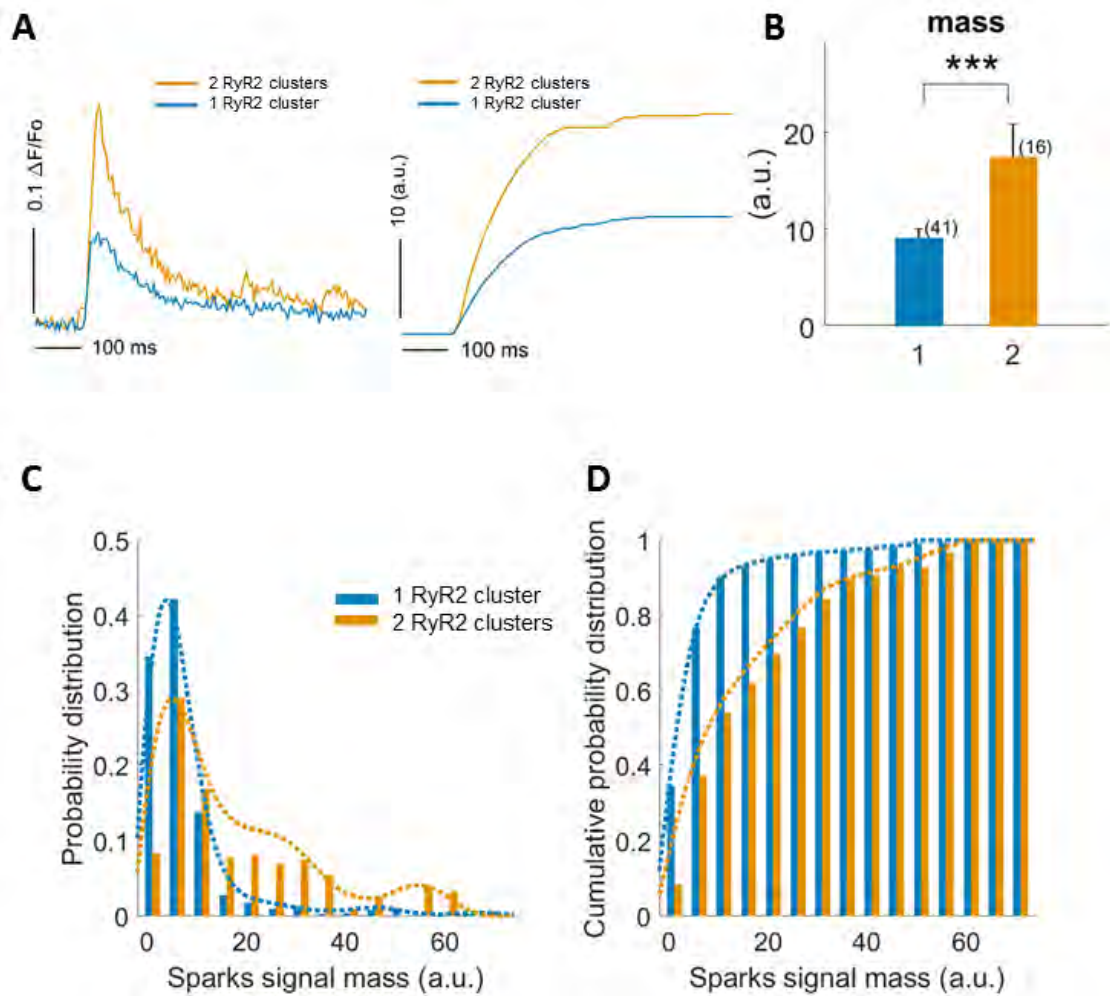


Figura 96. La massa dels *sparks* de dos clústers és el doble que la massa d'un *spark* d'un clúster

#### 4.2.2 Massa dels *sparks* de calci i distribució de probabilitat en HAM

En estudis anteriors de dinàmica del calci en cèl·lules humanes no s'ha establert el potencial arritmogènic dels *sparks* a partir de la massa del senyal. Fins al moment la investigació ha estat centrada en la cinètica i freqüència dels *sparks* de calci, és per aquest motiu que s'ha analitzat aquest atribut en cèl·lules de 46 pacients sense fibril·lació auricular i 40 pacients amb fibril·lació auricular. S'ha observat que els *sparks* dels pacients amb AF són més amples, duren més i són més freqüents (Fig. 97 i 98A-B).

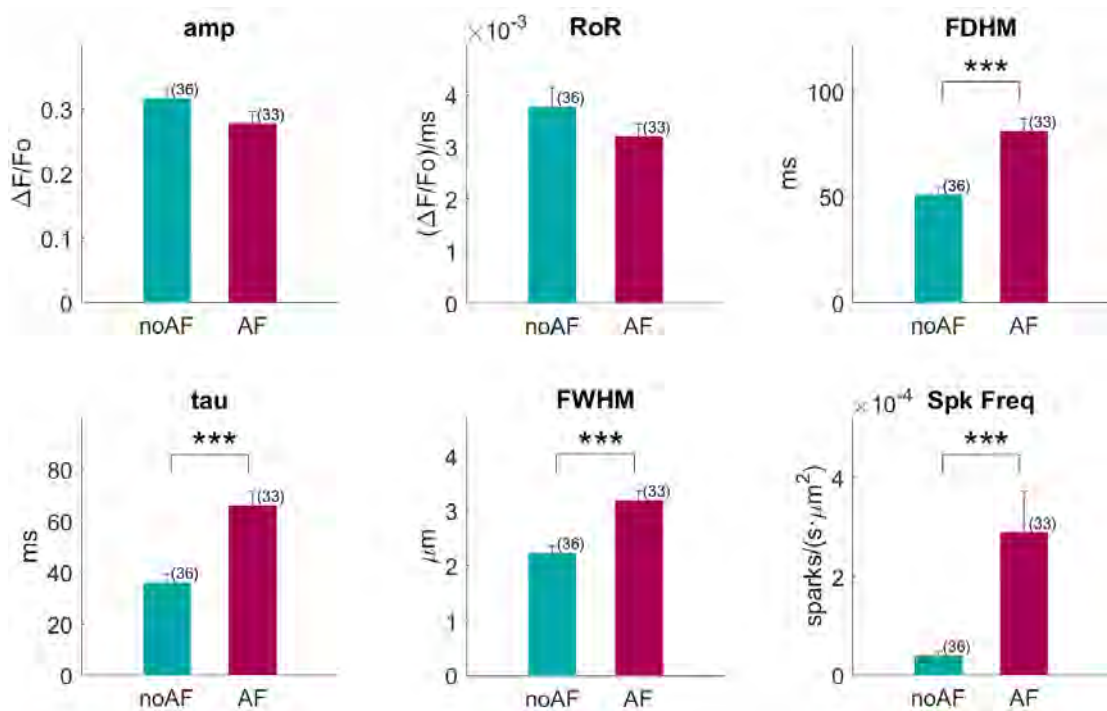


Figura 97. Propietats cinètiques dels *sparks* de pacients amb i sense AF

Aquestes variacions en la morfologia dels esdeveniments comporten un augment de la massa significatiu, essent  $16.9 \pm 1.9$  a.u. en pacients sense AF fins a  $25.4 \pm 2.6$  a.u. en pacients amb AF ( $p < 0.05$ ), Figura 98. La funció de distribució de probabilitat mostra que els *sparks* més grans que 20 a.u. són molt més freqüents en els pacients amb AF, essent la mediana i el rang interquantil  $10.67 \pm 10.92$  a.u. per les cèl·lules de pacients de control i  $22.86 \pm 23.37$  a.u. en pacients que patien de AF ( $p < 0.05$ ). Al comparar les distribucions de les cèl·lules HAM amb les de ratolí MVM de un i dos RyR2 clústers mostra que la distribució en pacients sense AF i la dels *sparks* de un RyR2 clúster són similars (Fig. 98D). Per altra banda, la funció de probabilitat acumulativa del miòcits amb AF arriba al punt màxim més lentament que la distribució de MVM 2 RyR2 clúster *sparks*, cosa que ens indica que hi ha esdeveniments amb més clústers involucrats en *sparks* de pacients amb AF o que s'allibera una quantitat de calci major per cada clúster.

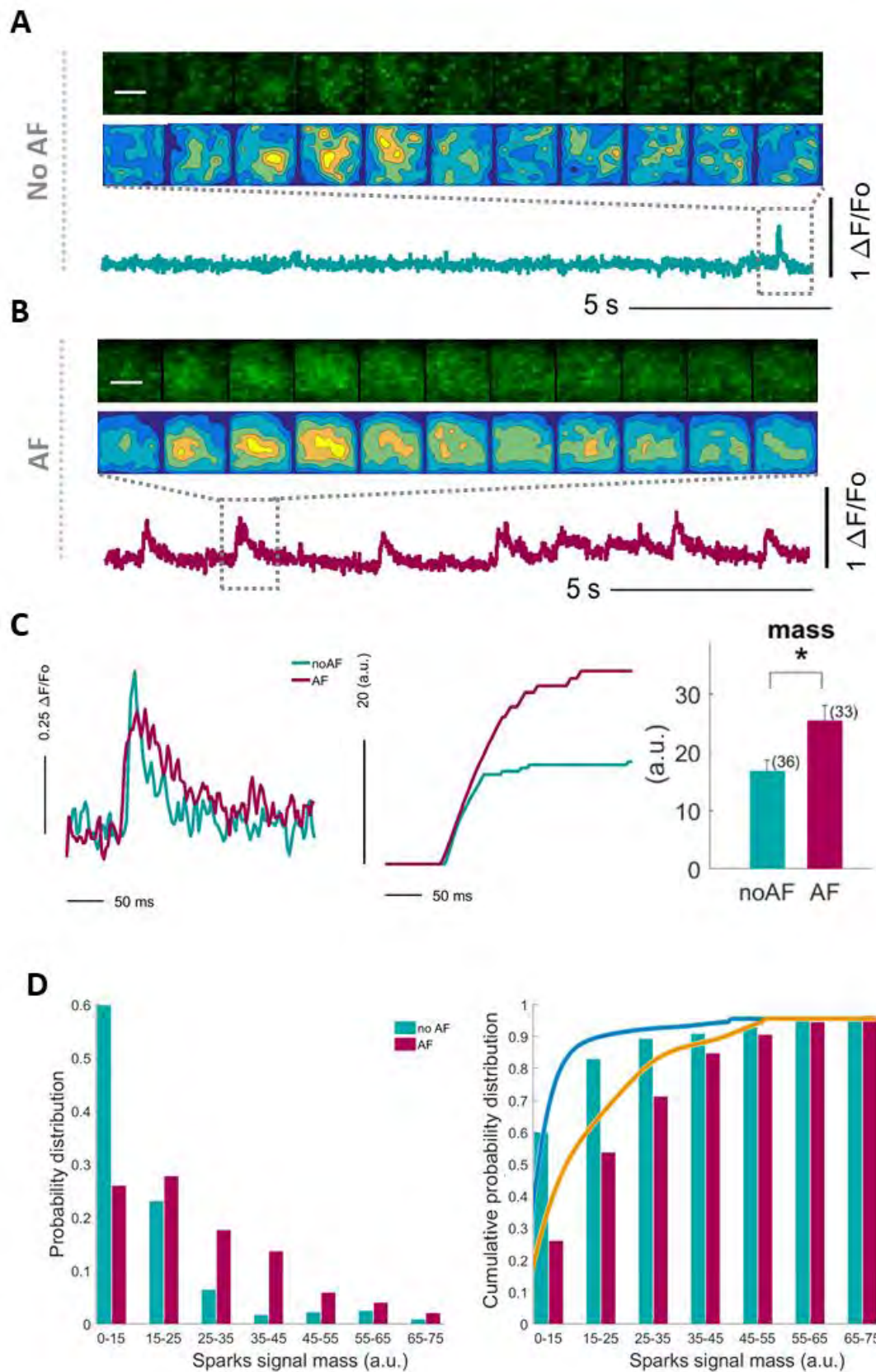


Figura 98. La massa dels sparks és més gran i més diversa en pacients amb AF que els que no la pateixen. A) Seqüència de fotogrames d'un spark d'un pacient no AF. B) Seqüència de fotogrames d'un spark d'un pacient amb AF. C) Comparació de la massa dels sparks dels diferents grups. D) Distribució i distribució acumulada de masses dels sparks[PO2].

### 4.2.3 L'estimulació $\beta_2$ -adrenergics replica la fibril·lació auricular

La fibril·lació auricular ha estat prèviament associada a la fosforilació de s2808 [5], [125], és per aquest motiu que s'ha estudiat l'efecte de l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica, per això s'ha usat el fàrmac agonista selectiu de  $\beta_2$ -adrenèrgic anomenat fenoterol (FENO). Amb aquesta estimulació s'ha pogut relacionar els resultats observats en pacients amb fibril·lació auricular i les cèl·lules de ratolins sotmeses al tractament de FENO. Aquest, dobla la ràtio de fosforilació en la serina s2809 en MVM amb els RyR2 marcats amb GFP (Fig. 99). També s'ha comprovat que la fracció de RyR2 de-fosforilats a s2808 és pràcticament la meitat en comparació als resultats obtinguts en control. A més a més, utilitzant el fàrmac inhibidor selectiu de la PKA (KT5720) es reverteix l'efecte del fenoterol, suggerint que l'estimulació  $\beta_2$ -adrenèrgica augmenta la fosforilació depenen de PKA en el s2808.

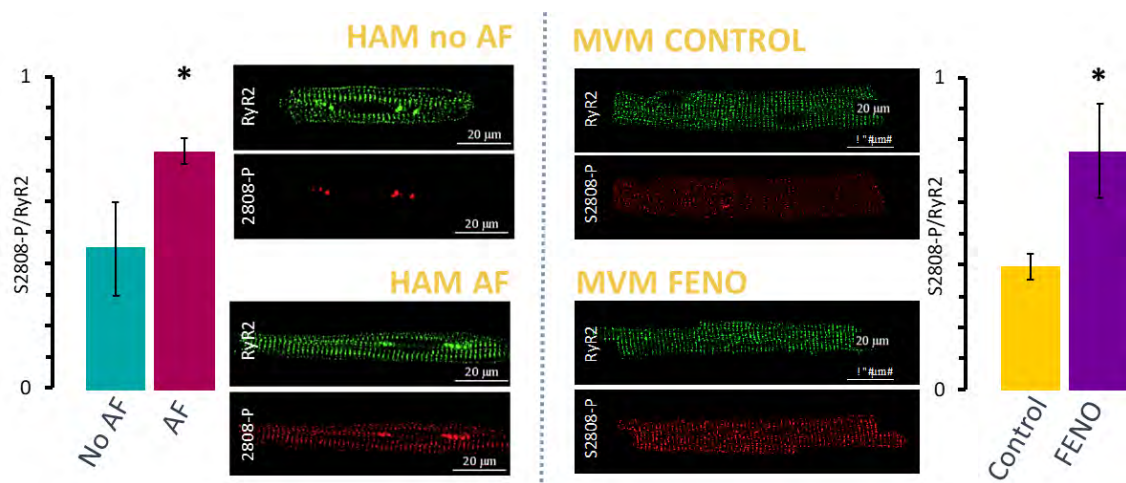


Figura 99. Quantificació de la fosforilació dels RyR2 clústers en experiments de HAM noAF/AF (panel Esquerra) i en experiments de MVM CON/FENO (panel dret). Es pot observar que ens els dos casos s'observa un augment en el nivell de fosforilació en la condició de malaltia, AF, i sota els efectes del fàrmac estimulador dels receptors  $\beta$ -AR, FENO.

L'anàlisi dels *sparks* sota els efectes de fenoterol mostra un augment d'esdeveniments de múltiples clústers, essent  $71.44 \pm 8.04\%$  *sparks* d'un sol RyR2 clúster ( $p < 0.001$  respecte al valor de control),  $19.29 \pm 2.97\%$  de *sparks* amb dos RyR2 clústers involucrats ( $p < 0.001$ ) i  $6.27 \pm 1.43\%$  de 3 clústers ( $p < 0.001$ ) (Figura 101). A més a més, s'ha observat que els *sparks* de 1 i 2 clústers tenen més amplitud i una durada més llarga, això comporta un augment massa del senyal de l'*spark* respecte als de control (Figura 102).

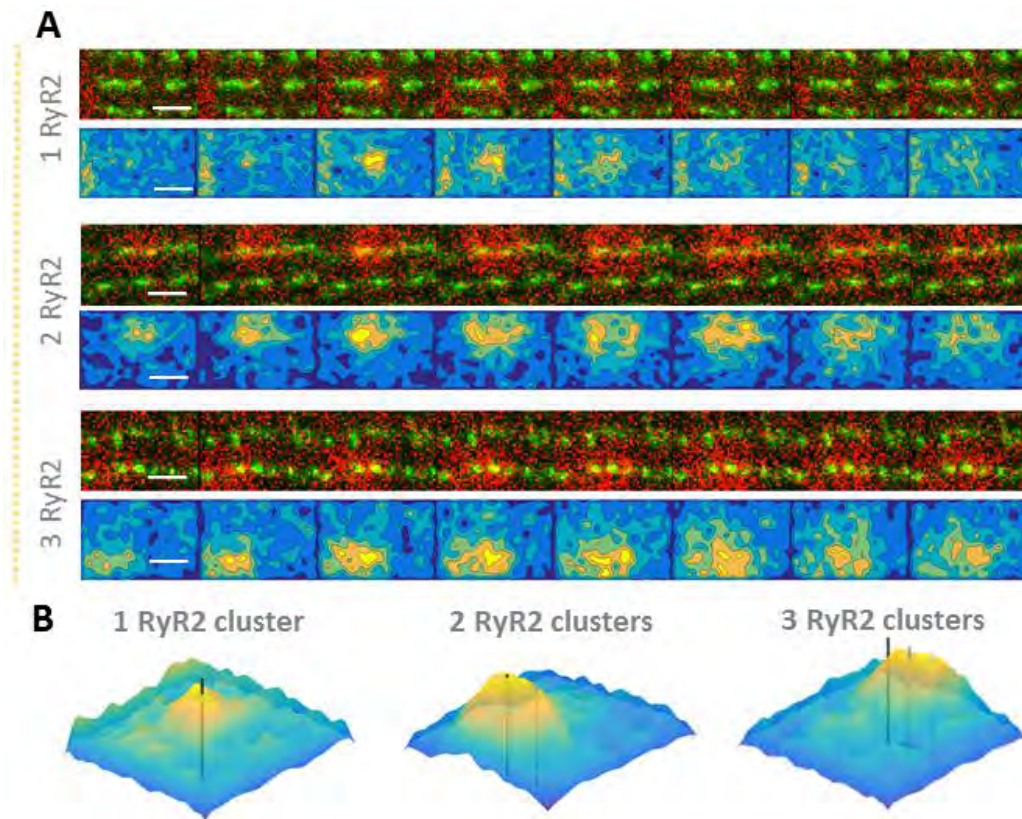


Figura 100. Exemples de *sparks* observats sota condicions d'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica amb fenoterol.

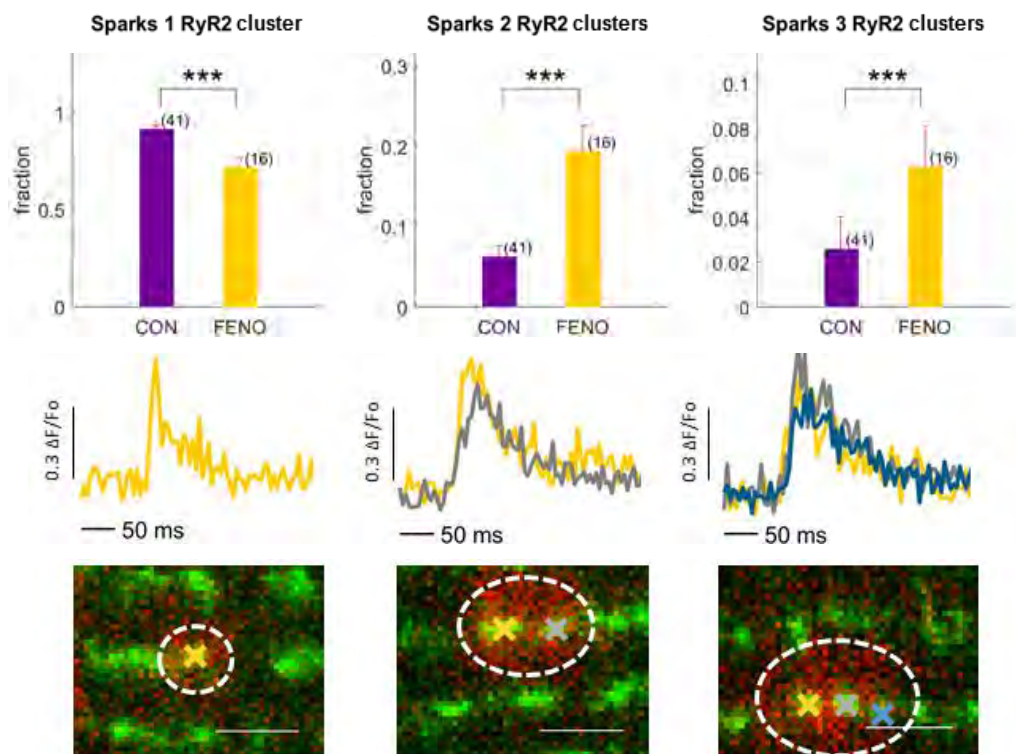


Figura 101. La estimulació  $\beta$ -adrenèrgica augmenta la fracció de *sparks* amb múltiples RyR2 coactivats.

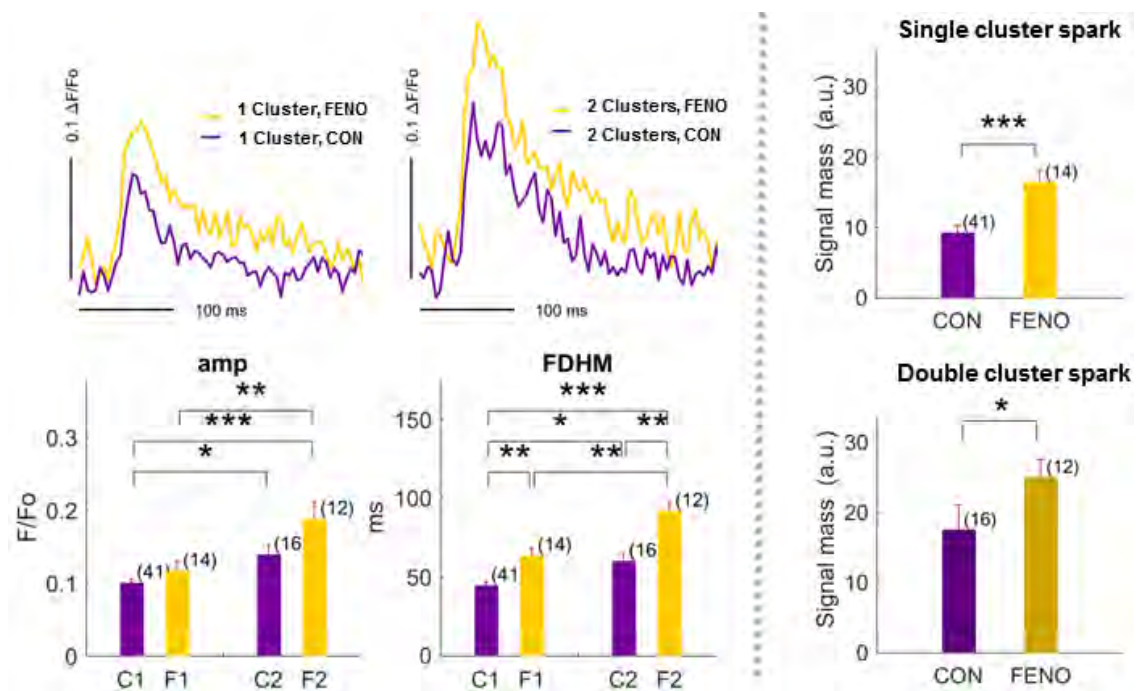


Figura 102. Paràmetres morfològic dels *sparks* de 1 i 2 RyR2 clústers sota condicions de control i fenoterol.

Al comparar la cinètica dels les activacions d'esdeveniment activadors d'un sol clúster o de dos RyR2 clústers (Fig. 103) s'observa que les activacions que coactiven al RyR2 clúster veí tenen una amplitud significativament més elevada ( $p < 0.05$ ) i una tendència que reflexa una dinàmica més lenta, fet que es veu representat en l'augment de la massa de les activacions precursors de *sparks* de dos clústers.

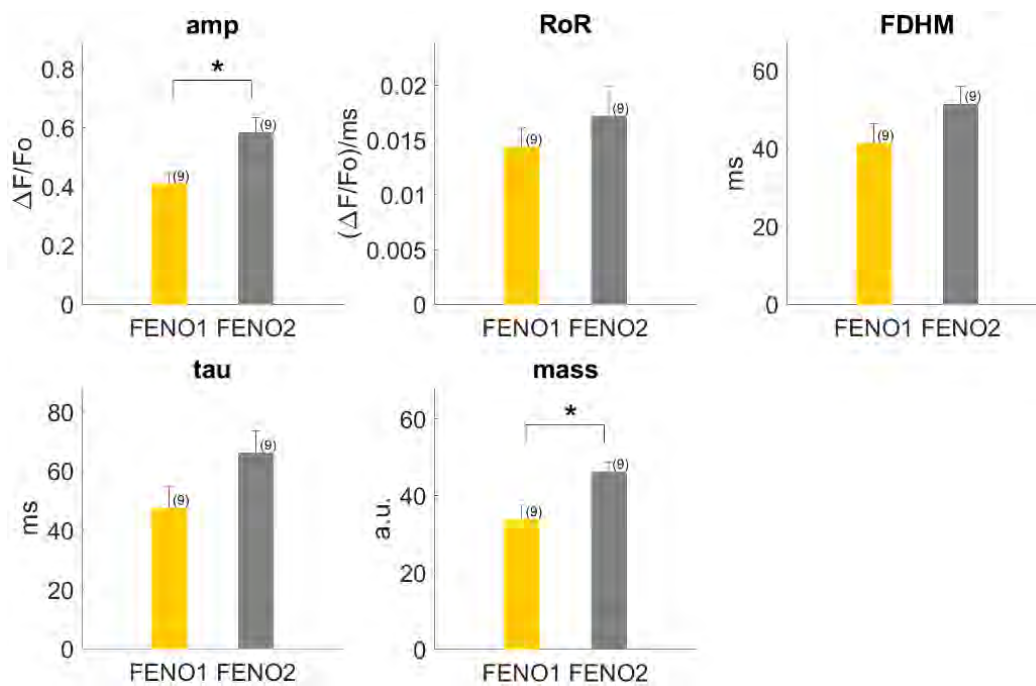


Figura 103. Propietats dels *sparks* simples i dobles sota els efectes de l'estimulació dels receptors  $\beta$ -adrenèrgics. Hi ha un percentatge més elevat d'esdeveniments de múltiples clústers (Fig. 101). La freqüència de *sparks* en les ROIs on hi ha hagut alliberacions de 2 RyR2 clústers augmenta respecte les ROIs amb



activitat d'un sol RyR2 sota els efectes de fenoterol, fet que no s'observa sota condicions de control (Fig. 104A-C). Observant l'activitat global de les cèl·lules la freqüència de *sparks* s'augmenta quatre cops respecte als casos de control ( $p < 0.01$ ) (Fig. 104A). També s'observa un augment molt pronunciat de la freqüència de *waves* sota els efectes de l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica ( $p < 0.001$ ) (Fig. 104A).

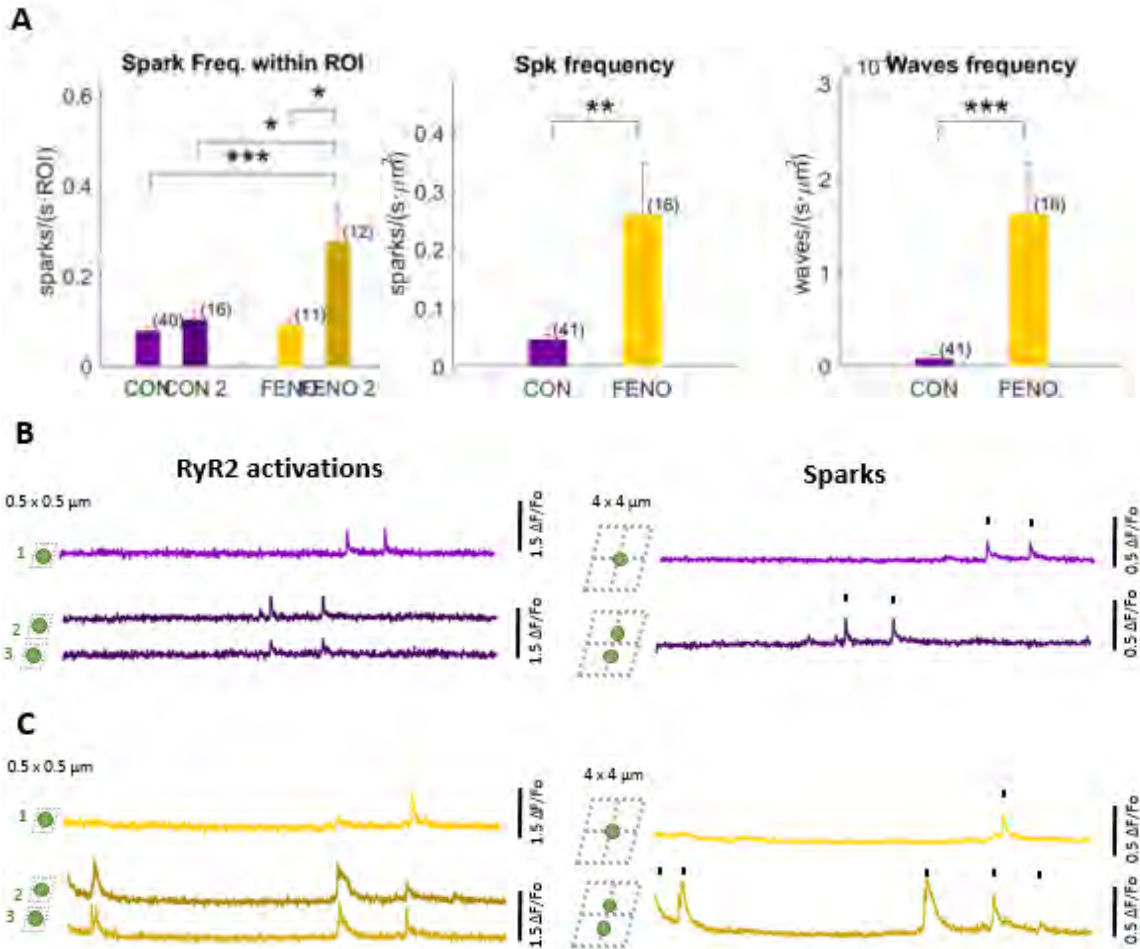


Figura 104. Activitat global de calci augmenta amb l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica

Finalment, s'ha utilitzat la distribució acumulativa de probabilitat per comparar la distribució de masses dels *sparks* de calci dels pacients amb o sense AF i les cèl·lules de ratolins en estat basal o estimulades amb fenoterol.

En la Figura 105 en l'apartat superior es pot observar l'augment de ROIs de *sparks* de un, dos i tres clústers. En el panell esquerra es mostren les activacions dels RyR2 clústers que conformen les ROIs i en el panell dret els senyals de les ROIs dels *sparks*. En el panell inferior es mostra la distribució de les masses dels *sparks* d'un, dos i tres RyR2 clústers sota els efectes de Fenoterol. Es pot observar com al augmentar el nombre de clústers augmenta la massa del *spark*.

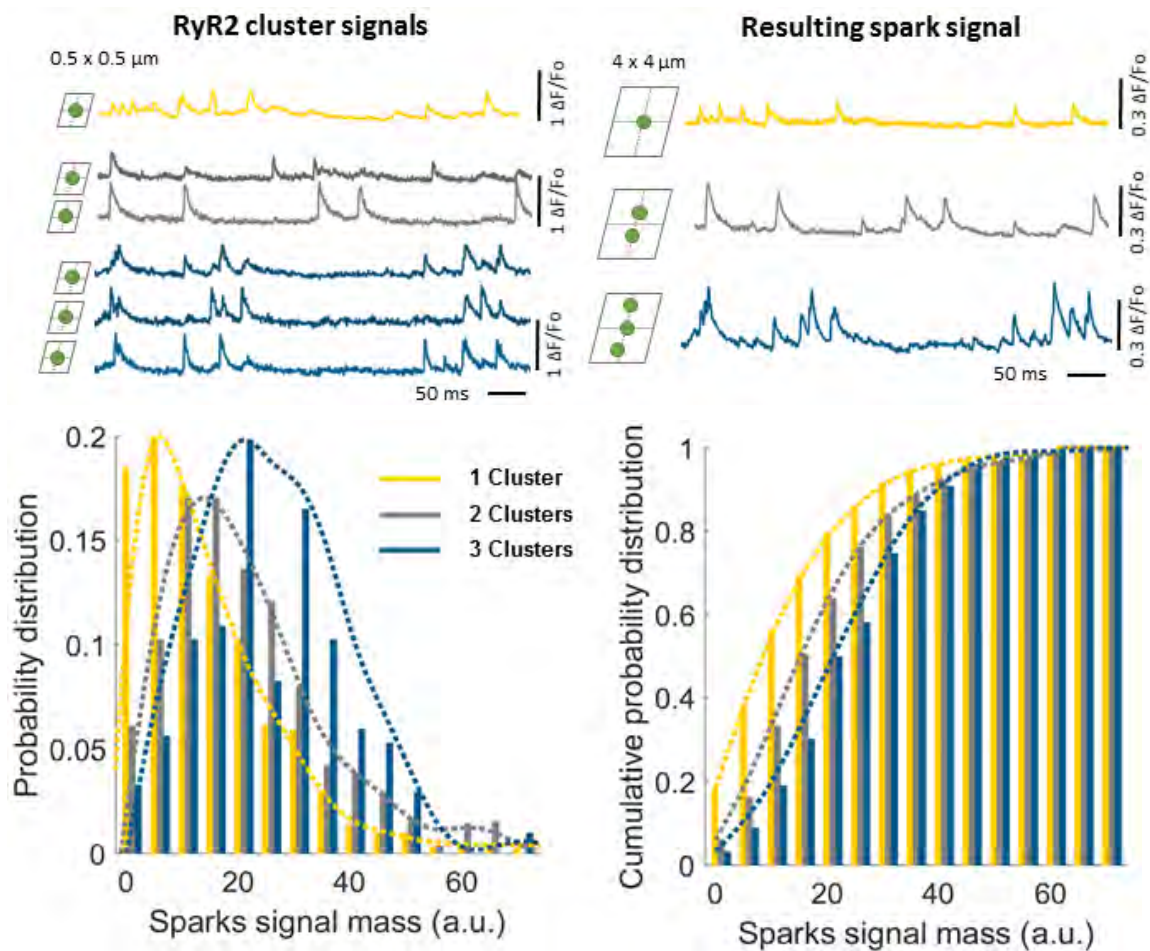


Figura 105. La estimulació  $\beta$ -adrenèrgica augmenta la massa del senyal de l'*spark* de calci

Tal i com es mostra en la Figura 106A-B, la funció de probabilitat acumulativa dels miòcits de pacients sense AF és similar a la distribució de les masses en estat de control de les cèl·lules ventriculars de ratolí. Per altra banda, en la Figura 106C-D es mostra com la distribució acumulativa de probabilitat dels miòcits de pacients que patien AF és similar a la distribució dels *sparks* de dos RyR2 clústers sota els efectes de FENO. En la Figura 106E es mostren totes les CDF sobreposades, clarament es pot observar que sota els efectes de control la massa es comporta més similar al que s'observa en pacients sense AF i la distribució de masses sota els efectes de fenoterol s'acosta més al que s'observa en cèl·lules de pacients que pateixen AF.

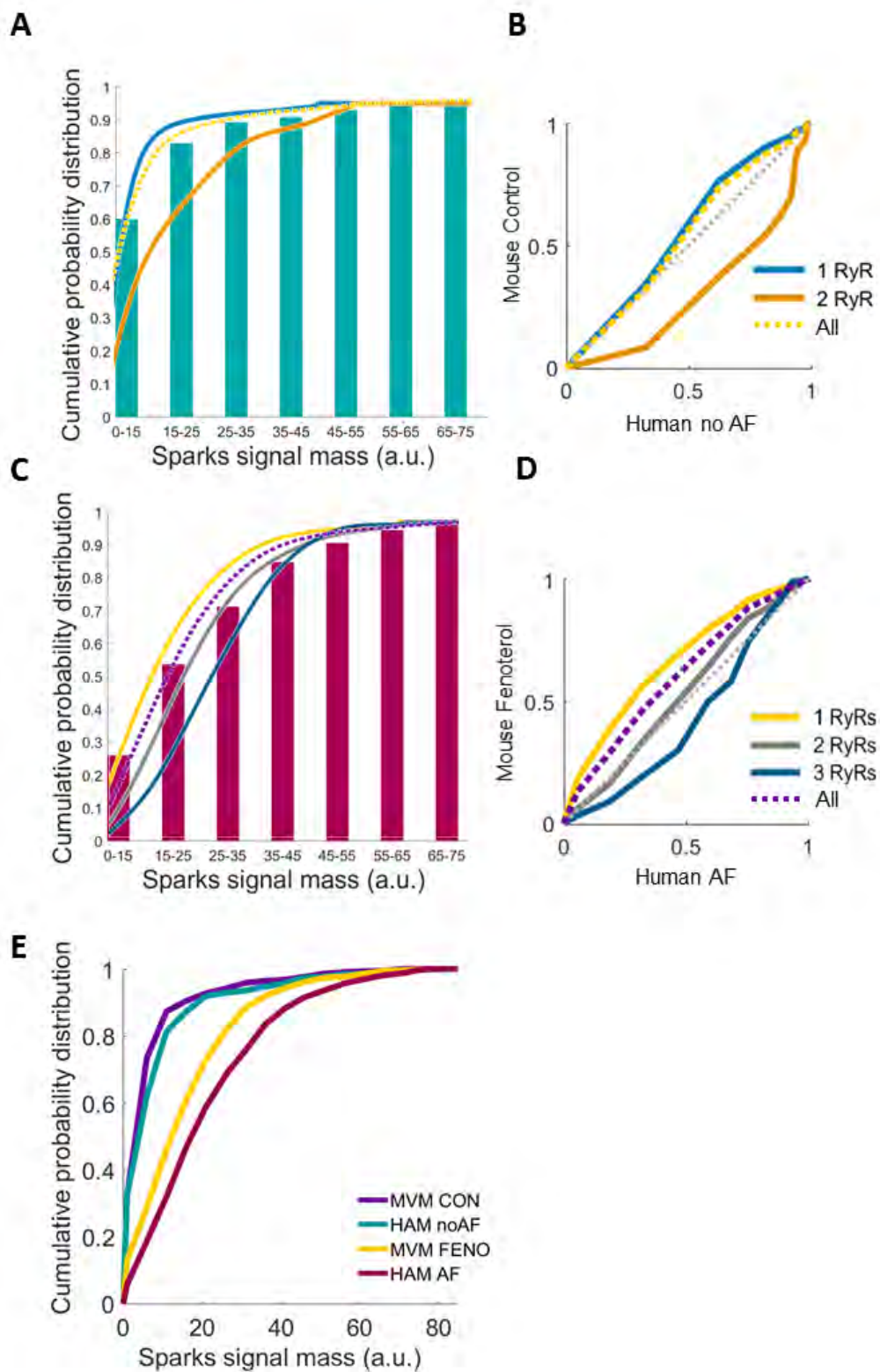


Figura 106. La estimulació  $\beta$ -adrenèrgica imita el canvi en la distribució de masses dels senyals de *sparks* observat en casos de fibril·lació auricular [P02].

## 4.3 DISCUSSIÓ

---

Utilitzant ratolins amb el marcatge amb GFP dels RyR2 clústers s'ha pogut demostrar que els *sparks* en condicions de control tenen lloc quan s'activa un RyR2 clúster (91.6% de tots els *sparks*) o es coactiven dos RyR2 clústers (8.0% de tots els *sparks*). Tanmateix, la massa del senyal de dos clústers és pràcticament el doble que la d'un *spark* d'un sol clúster i la distribució de probabilitat de les masses dels *sparks* en miòcits auriculars d'humans que no patien AF és similar a la distribució observada en els cèl·lules ventriculars de ratolí sota condicions de control. Per altra banda, s'ha observat que els miòcits de pacients amb AF es veu desplaçada a masses més grans, fet que és replicat en les cèl·lules de ratolí sota els efectes de la estimulació  $\beta$ -adrenèrgica. Per tant, s'augmenta la massa del senyal de l'*spark* i el percentatge del nombre de *sparks* amb múltiples clústers.

### *Cinètica dels sparks i massa del senyal*

La freqüència i les propietats cinètiques dels *sparks* s'han estudiat tant en mamífers com en humans per observa la influència de tractament farmacològics, les condicions patològiques de l'activitat dels RyR2 i l'alliberament espontani de calci del SR [124]. S'ha vist amb anterioritat que l'amplitud, la duració i el decaïment dels *sparks* són alterades mitjançant diferents fàrmacs com ara la estimulació  $\beta$ -adrenèrgica. En aquest estudi es mostra com les propietats dels *sparks* de calci varien depenent del nombre de clústers que han estat activats durant l'esdeveniment, augmentant amb el nombre de RyR2 l'amplitud, durada i amplada de l'*spark*. La combinació d'aquestes característiques determinen l'habilitat de l'*spark* d'acabar produint un esdeveniment d'alliberació més gran, suggerint que la massa total del senyal de calci pot ser una bona mesura del potencial arritmogènic de l'*spark*.

S'ha vist que sota condicions de control més del 90% dels *sparks* tenen lloc quan un sol RyR2 clúster allibera calci espontàniament, la resta tenen lloc quan l'alliberament d'un RyR2 clúster promou que els veïns també s'obrin, per tant, les propietats de l'*spark* i la seva massa estan determinats pel nombre de RyR2s en un RyR2 clúster que ha estat activat. A més a més, la massa del senyal de calci és similar en el clúster activador que el que ha estat activat, per tant la presència de *sparks* de dos clústers en el nivell basal no és proporcional al volum de calci alliberat pel RyR2 iniciador, sembla que depèn més del llindar del clúster veí per obrir-se espontàniament, SOICR.

### *Modulació neuro-hormonal en les propietats i massa de l'spark*

L'estrès  $\beta$ -adrenèrgic se sap que compota un augment espontani d'alliberament de calci i taquicàrdia ventricular en ratolins [126] i que causa CPVT en humans [127]. Aquest estrès pot augmentar la massa dels *sparks* activant un major nombre de RyR2s en un RyR2 clúster o bé afavorint l'activació de múltiples RyR2 clústers en un *spark*. S'ha observat que l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica augmenta la

massa del senyal de l'*spark* d'un sol clúster. Tanmateix, augmenta la fosforilació depenent de PKA en la s2808 del RyR2, fet que promou que augmenti la seva probabilitat d'obertura [15], suggerint que aquesta augment en la massa de l'*spark* és degut a l'activació d'un major nombre de RyR2s dins del clúster. Per altra banda, hi ha un augment de tres vegades el nombre de *sparks* de dos i tres clústers en els miòcits tractats amb fàrmacs estimuladors dels receptors  $\beta$ -Adrenèrgics. Aquest fet indica que la estimulació dobla el volum de calci alliberat d'un *spark*, augmentant el nombre de RyR2s actius en un clúster i el nombre de *sparks* amb activacions de múltiples clústers.

#### *Relació entre la massa dels sparks de calci i la fibril·lació auricular*

L'arrítmia com el CPVT o la fibril·lació auricular com la fallada cardíaca ha estat associada a un excés de fosforilació en els RyR2, fet que provoca alteracions com ara l'augment de la freqüència d'esdeveniments espontanis, tant *sparks* com *waves*, que conseqüentment poden provocar despolaritzacions espontànies de la membrana dels miòcits auriculars [128]. La integració d'aquestes propietats en un sol paràmetre, la massa del senyal de l'*spark*, pot ser útil a l'hora de mesurar el potencial arritmogènic. En suport a aquesta hipòtesis, la mitjana de la massa de l'*spark* augmenta tres vegades quan les cèl·lules han rebut el tractament  $\beta$ -AR estimulador i la funció de distribució de probabilitat de la massa de l'*spark* ha estat desplaçada d'una mediana de 8 a.u. a 18 a.u. al aplicar el tractament.

S'ha vist que la massa dels *sparks* de pacients sense fibril·lació auricular pren uns valors i correspon a una distribució de probabilitat acumulativa similar a les masses observades dels *sparks* de 1 i 2 clústers de ratolins en condicions de control. Per altra banda, s'ha vist que el valor promig de la massa dels pacients que patien fibril·lació auricular era 50% més gran que la dels pacients sense AF, i la distribució de probabilitat passa d'una mediana de 12 a.u. dels pacients sense AF a 23 a.u. en el pacient amb arrítmia. Aquesta mediana és més gran que la de la distribució de masses dels miòcits de ratolins quan han estat sotmesos al tractament amb fenoterol. Els resultats revaliden l'afirmació que l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica es comporta com la hiperfosforilació dels RyR2 observada en AF, augmentant el nombre d'alliberacions espontànies de calci. Tanmateix, aquest resultat també suggereixen que hi ha més alteracions patològiques en la homeòstasis del calci per arribar a obtenir valors de massa similars als observats en AF.

#### *Limitacions de l'estudi*

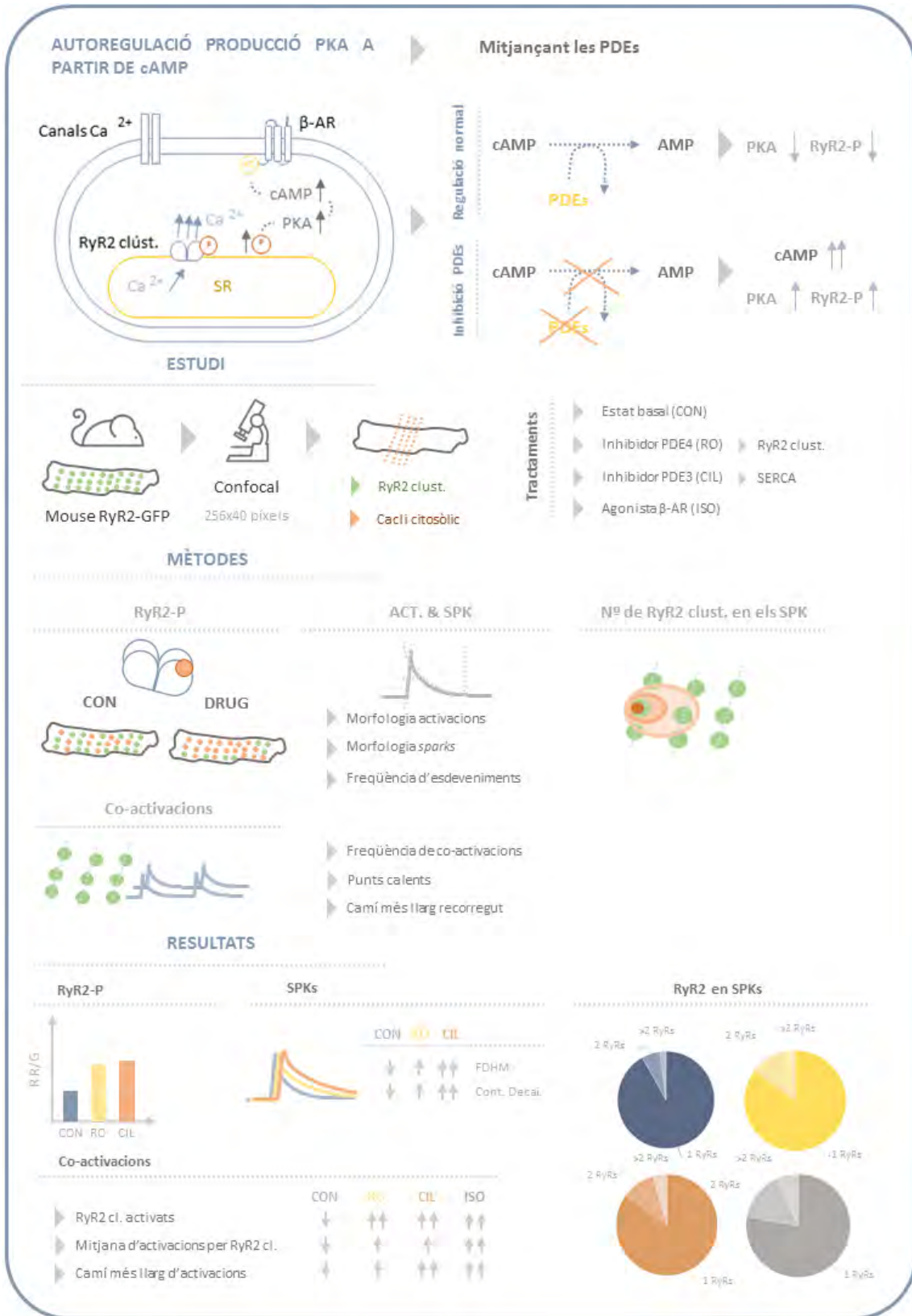
Tenint en compte les consideracions ètiques i les limitacions de la disponibilitat de teixit auricular d'humà, l'aïllament dels miòcits auriculars humans només és possible utilitzant teixit de l'aurícula esquerra de pacients que han estat sotmesos a una intervenció quirúrgica que requereix circulació extracorpòria. Tanmateix, s'ha de tenir en compte que el teixit prové de donants amb una malaltia prèvia, fet que podria influir en els resultats. També s'ha de tenir en compte que algunes

característiques de l'aurícula dreta poden variar respecte l'aurícula esquerra. A més a més, per establir la distribució de probabilitat acumulativa de les masses dels *sparks* es requereix d'un gran nombre d'esdeveniments provinent d'un nombre raonable de diferents pacients per evitar que tots provinguin d'una mateixa cèl·lula i es produeixi un esbiaix en els resultats. Per minimitzar aquest problema s'ha utilitzat un gran nombre de miòcits en estat de control de ratolí i d'humans sense historial de fibril·lació auricular on els *sparks* de calci eren menys abundants.

# CAPÍTOL 5

**ESTUDI D'ESDEVENIMENTS DE CALCI SOTA  
ELS EFECTES DELS INHIBIDORS DE PDEs I ELS  
ESTIMULADORS BETA-ADRENÈRGICS**

# ABSTRACT GRÀFIC





L'arrítmia cardíaca ha estat relacionada amb la hiperfosforilació dels RyR2, i en els darrers anys s'ha observat una relació entre la fisiologia anormal de les phosphodiesterases (PDEs) amb les malalties que afecten al ritme cardíac [3], [4], [8], [9], [125]. També és sabut que l'estimulació dels receptors  $\beta$ -adrenèrgics ( $\beta$ -AR) afecta en la funció dels miòcits cardíacs [129], [130]. Ambdues situacions promouen l'augment de cAMP de diferent forma i per tant a l'activació de la PKA, que és responsable de fosforil·lar proteïnes reguladores del calci en cardiomiòcits, com ara els RyR2, el PLB i els canals de calci, entre altres [44].

Les fosfodiesterases són les responsables de trencar el cAMP en AMP, regulant la producció de cAMP. Si no es frena la producció de cAMP, l'activació de la PKA augmenta i promou l'hiperfosforilació de proteïnes reguladores del calci. Dintre el grup de les PDEs en trobem 11 subfamílies diferents, de les quals només de la 1-4 estan presents en el teixit cardíac i dintre d'aquest grup la PDE3 i PDE4 són les més abundants [43]. És sabut que aquestes subfamílies estan distribuïdes en localitzacions diferents de la cèl·lula, PDE4 està localitzada en un clúster macromolecular del RyR2 [131], [132] i PDE3 en un altre clúster macromolecular associat al SERCA [133], [134]. Aquesta diferència en les localitzacions indica que actuen de forma lleugerament diferent i, per tant, tenen un comportament diferent en la fisiologia del calci.

Els receptors  $\beta$ -adrenèrgics són els capdavanters de la cadena de la fosforilació dependent de PKA. Quan són excitats, activen a l'AC i promouen la producció de cAMP, si les PDEs no són capaces de regular aquest procés es produeix una hiperfosforilació del RyR2 [135],[136]. Existeixen tres tipus de  $\beta$ -AR ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 i  $\beta$ 3) els quals també tenen comportaments lleugerament diferents en vers la fisiologia del calci [136].

En aquest context, estudiar la localització i el grau de fosforilació dels RyR2 permetrà conèixer les implicacions d'aquest procés en la dinàmica del calci a nivell cel·lular.

## 5.1 HIPÒTESI I OBJECTIUS

---

En base als recents estudis la hipòtesi de treball és que PDE3, PDE4 i ISO modifiquen de forma diferent l'activitat en els RyR2 clústers. S'ha estudiat l'activitat i fisiologia a partir de l'activitat de calci citosòlic, però en l'actualitat no hi ha estudis que relacionin aquesta activitat amb els RyR2 clústers i la hiperfosforilació. Mitjançant els ratolins modificats genèticament els quals expressen GFP en els RyR2 i els fàrmacs inhibidors de PDEs o  $\beta$ -AR agonistes, és possible estudiar els esdeveniments espontanis de calci simultàniament amb la localització dels RyR2 clústers en condicions d'alts nivells de fosforilació.

## 5.2 MATERIALS I MÈTODES

---

Sota les condicions d'inhibició de les PDEs i d'estimulació dels receptors  $\beta$ -AR, donat l'augment observat en la fosforilació dels canals de RyRs en imatges d'immunofluorescència i amb els antecedents observats que provoca aquesta modificació fisiològica, s'ha realitzat un estudi l'activació clústers individuals de RyR2s sota diferents condicions fisiològiques per entendre la relació entre l'activitat dels clústers individuals de RyR2 i la inducció a l'alliberació de calci espontani en cadena. Amb aquest propòsit, les cèl·lules emprades provenen dels ratolins modificats genèticament amb RyR2-GFP. Les cèl·lules, s'han aïllat utilitzant el mètode Langerdorf i s'han carregat amb calci (Metodologia apartat 2.1.1). La visualització del nivell de calci s'ha realitzat amb microscopia confocal amb alta resolució temporal, 40x256 píxels i 4.16 ms (Metodologia apartat 2.1.3, taula 8).

Per tal d'observar l'efecte de la inhibició de les PDEs i promoure la fosforilació de les cèl·lules, s'han utilitzat fàrmacs inhibidors de fosfodiesterases, PDE3 i PDE4 (CIL i RO), que són les responsables d'inhibir la degradació del cAMP. El fet d'inhibir les PDEs altera l'autoregulació de la cèl·lula, augmentant el cAMP disponible, per tant, es mostra que provocaria en la fisiologia cel·lular la manca d'aquestes fosfodiesterases. També s'ha utilitzat un fàrmac agonista no selectiu dels receptors  $\beta$ -adrenèrgics,  $\beta_1 + \beta_2$  (ISO), que estimula la producció de cAMP. Aquesta és una altra forma d'augmentar el cAMP estimulant des de l'inici de la via metabòlica en comptes d'intervenir en la regulació de la mateixa, com és en el cas de les fosfodiesterases. Sota les tres condicions s'ha observat en estudis anteriors augments en la fosforilació de les cèl·lules.

Per a comparar cèl·lules en condicions de control amb cèl·lules sota l'efecte d'un fàrmac, s'ha realitzat els registres primer en condicions fisiològiques normals amb una perfusió de medi fisiològic (Control, CON) a 37°C. Un cop finalitzats, s'ha perfusionat durant 10-15 minuts un fàrmac també a 37°C i passat aquest temps s'ha tornat a realitzar un nou registre. En la taula 27 es mostren les concentracions de cada fàrmac utilitzat en l'estudi.

Taula 27. Resum de registres, concentracions i nombres d'experiments realitzats

<b>Tractament</b>	<b>Concentració</b>	<b>#Ratolins</b>	<b>#Cèl·lules</b>	<b>#Series</b>	<b>#Fotogrames</b>
CON	2mM Ca <sup>2+</sup>	32	92	368	2.720.256
RO	10 $\mu$ M	23	61	244	1.803.648
CIL	1 $\mu$ M	23	56	224	1.655.808
ISO	50 nM	7	38	152	1.123.584

A l'hora de realitzar comparacions estadístiques entre dues condicions s'ha fer mitjançant el Wilcoxon test, ja que la majoria de les dades no segueixen una distribució normal, comprovant-ho mitjançant el Kolmogorov-Smirnov test. Els p-valors es representaran mitjançant asteriscs, essent  $p < 0.1$  \*,  $p < 0.05$  \*\* i  $p < 0.001$  \*\*\*.

## 5.3 LOCALITZACIÓ D'ESTRUCTURES DE RYR2 I QUANTIFICACIÓ DE LA FOSFORILACIÓ

Per saber com afecten a nivell molecular les PDEs s'han analitzat 54 cardiomiòcits ventriculars de ratolí RyR2-GFP, s'ha vist en estudis anteriors mitjançant la tècnica de western blot que hi ha un augment de la fosforilació dependent de PKA inhibint les PDEs [131], [133]. En aquest estudi s'ha utilitzat imatges d'immunofluorescència amb dos canals de fluorescència, un per als RyR2 etiquetats genèticament amb la GFP que correspon al canal verd i un segon canal vermell que correspon al marcatge d'immunofluorescència el grup fosfat a la serina 2809 realitzat amb un anticòs primari rabbit de anti-ser2809-P i un anticòs secundari vermell anti-rabbit. Mitjançant la detecció amb el mètode de segmentació *watershed* (Metodologia apartat 2.2) s'han detectat els RyRs i s'ha realitzat la caracterització de les diferents propietats dels RyR2 clústers en les diferents condicions. De les cèl·lules utilitzades s'ha obtingut imatges de 37 cèl·lules en estat basal (CON), 36 cèl·lules sota els efectes de Ro 20-1724 (RO) i 16 amb Cilostamide (CIL), que corresponen a inhibidors de PDE4 i PDE3 respectivament [PC3], [PC6].

Taula 28. Característiques dels RyRs segons on estan localitzades en la cèl·lula. S'han dividit en dos compartiments: Centre de la cèl·lula (CC) i Sarcolemma (SL). DNN: *distance to nearest neighbor*.

RyRs	DNN nm		Densitat RyRs/ $\mu\text{m}^2$		Radi PSF RyRs nm	
	CC	SL	CC	SL	CC	SL
CON	943.72 $\pm$ 5.13	877.62 $\pm$ 1.22	0.50 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.02	206.62 $\pm$ 6.34	198.82 $\pm$ 7.36
RO	951.31 $\pm$ 2.12	955.44 $\pm$ 1.13	0.45 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.01	178.38 $\pm$ 1.22	154.90 $\pm$ 1.42
CIL	921.13 $\pm$ 1.34	879.31 $\pm$ 3.82	0.52 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.02	206.63 $\pm$ 5.88	185.32 $\pm$ 2.01

Taula 29. Taula de ràtios de fosforilació de S2809 (intensitat de vermell/intensitat de verd) per a cada condició. Els p-valors mostren la comparació entre CON i el fàrmac en qüestió per a cada regió de la cèl·lula.

RyRs-P	Ràtio Fosforilació	
	Ir/Ig	
	CC	SL
CON	0.52 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.07
RO	0.86 $\pm$ 0.07 ***	1.15 $\pm$ 0.21 **
CIL	0.95 $\pm$ 0.16 ***	1.69 $\pm$ 0.36 ***

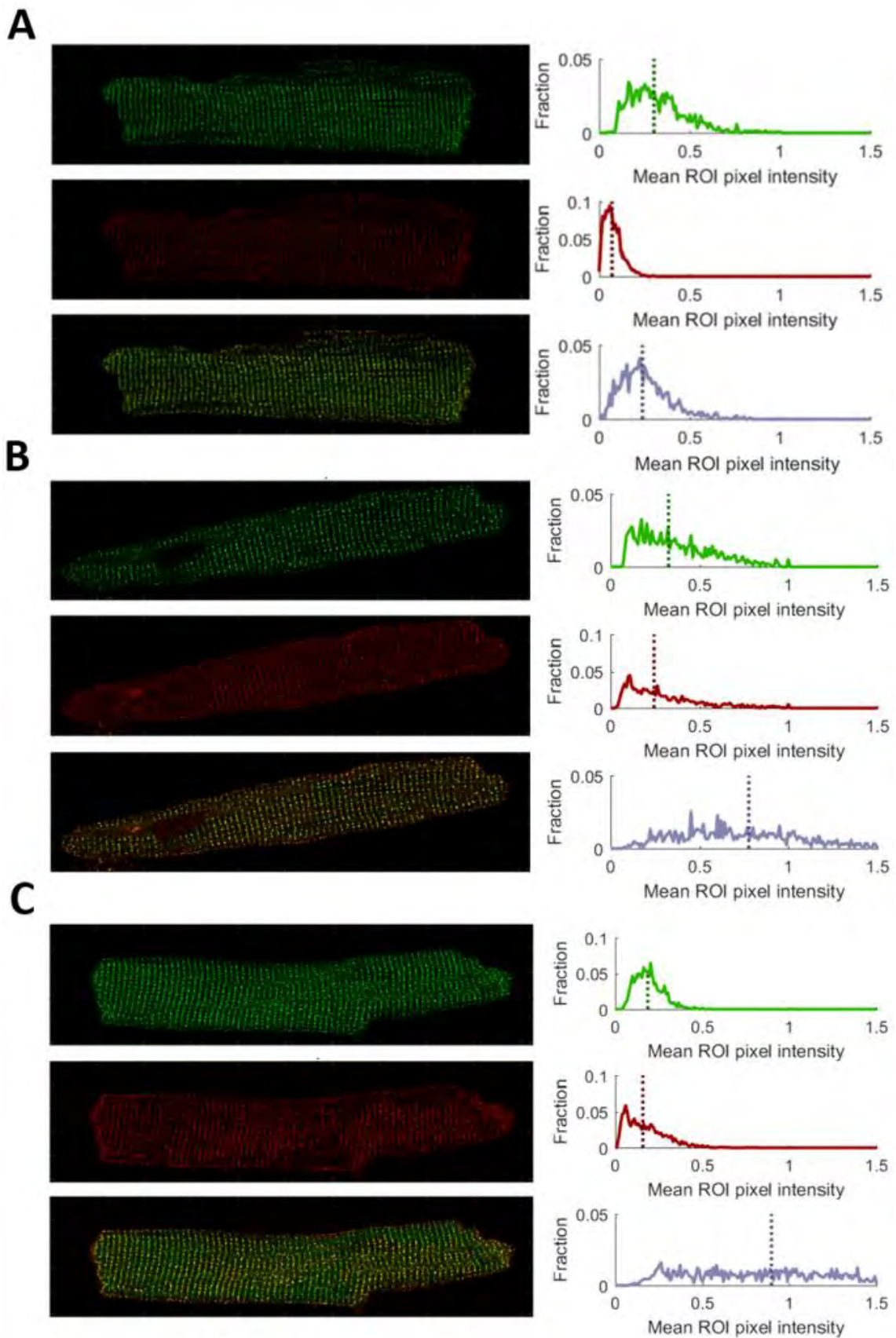


Figura 107. Exemple del càlcul de la ràtio de fosforilació en el centre dels cardiomiòcits en condicions normals (A) i sota els efectes de RO (B) i CIL (C). Es pot comprovar visualment que les cèl·lules sota els efectes dels inhibidors de PDEs tenen un grau fosforilació més elevat ja que presenten una intensitat de fluorescència vermella més alta, en comparació a la cèl·lula de control.

## 5.4 CARACTERITZACIÓ GENERAL DE L'ACTIVITAT DEL CALCI

### 5.4.1 Morfologia de les activacions de RyR2 clústers

Anomenem activació de RyRs al procés d'alliberació espontània de calci per sobre de l'estat basal que experimenta un clúster de canals de RyRs. Els senyals provinents de cada clúster han estat mesurats en una ROI de  $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}$ .

La taula 30 emmarca la comparació dels paràmetres de les activacions dels clústers obtinguts dels cardiomiòcits en estat basal (control) i sota els efectes dels diferents fàrmacs. Es pot observar que l'amplitud en els miòcits tractats amb CIL i ISO és significativament menor que el dels miòcits control ( $p=0.08$  i  $p=0.03$ , respectivament). El FDHM té una durada superior amb tots els fàrmacs: RO ( $p=0.02$ ), CIL i ISO ( $p<0.001$ ), fet que ve acompanyat per l'augment de la constant de decaïment RO ( $p=0.02$ ), CIL ( $p=0.002$ ) i ISO ( $p=0.004$ ). La ràtio de pujada del calci és un paràmetre que s'ha calculat a partir de 5 punts, per tant si el senyal és sorollós pot ser poc precís, tot i així es pot observar que és més lenta per a ISO ( $p<0.001$ ) fet que repercuteix directament en el temps fins arribar al pic ( $t_{2p}$ ), que és més llarg sota els efectes dels mateix fàrmac ISO ( $p<0.001$ ).

Taula 30. Paràmetres morfològics de la dinàmica de les activacions d'un clúster de RyR2. Es mostren els p-valors dels fàrmacs en comparació amb els resultats obtinguts de les cèl·lules de control.

ACTs.	Amplitud $\Delta F/F_0$	RoR $(\Delta F/F_0)/\text{ms}$	$t_{2p}$ ms	FDHM ms	Ct. Decaïment ms
CON	$0.49 \pm 0.02$	$0.025 \pm 0.001$	$19.96 \pm 1.06$	$24.76 \pm 1.06$	$28.31 \pm 2.07$
RO	$0.45 \pm 0.04$	$0.027 \pm 0.003$	$16.93 \pm 0.88$	$33.11 \pm 3.77^*$	$34.68 \pm 3.44^*$
CIL	$0.42 \pm 0.02$	$0.025 \pm 0.001$	$18.63 \pm 1.00$	$39.55 \pm 3.41^{***}$	$38.83 \pm 2.35^{**}$
ISO	$0.41 \pm 0.03^*$	$0.016 \pm 0.001^{***}$	$27.03 \pm 1.39^{***}$	$32.53 \pm 2.34^{***}$	$40.78 \pm 3.63^{**}$

Per tant s'observa que sota els efectes dels diferents inhibidors de PDEs i agonistes dels  $\beta$ -AR augmenten el nivell de cAMP les activacions dels RyR2 clústers tenen una dinàmica més lenta i que aquesta és especialment accentuada sota els efectes de l'estimulador  $\beta$ -AR.

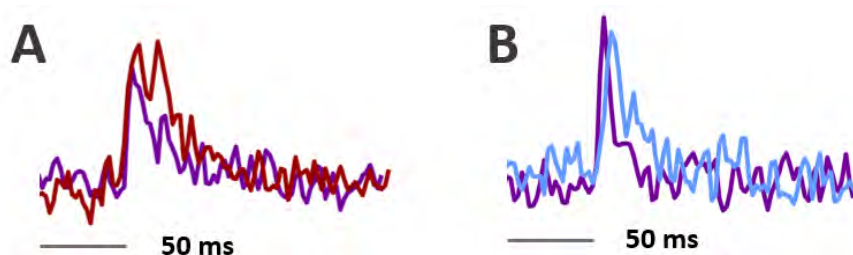


Figura 108. Traços de la fluorescència dintre de la ROI que mostren les activacions individuals de RyR2 clústers: A) CON (lila) i RO (vermell), B) CON (lila) i CIL. (blau).

## 5.4.2 Propietats morfològiques dels *sparks*

Després de caracteritzar les activacions, aquestes han estat agrupades en *sparks* mitjançant el *Hierarchical clustering* en tres dimensions, utilitzant la distància espacial (2  $\mu\text{m}$ ) i temporal (50 ms) com a norma per a la divisió. S'ha obtingut els senyals dels *sparks* a partir de les quals s'ha estimat els paràmetres morfològics de la dinàmica d'aquest esdeveniments de calci.

Observant la taula 31 i la Figura 110, de la morfologia dels *sparks* destaquen canvis similars als observats en les activacions dels RyR2 clústers, principalment es tracta de l'augment de la durada de l'activitat del calci sota els efectes dels diferents fàrmacs. L'efecte més destacat en totes les diferents condicions és l'elongació de la durada dels *sparks*. També es pot observar que el paràmetre de la massa del senyal és el que recull i resumeix els petits canvis observats amb les diferents condicions, que tot i no ser significatius acaben tenint un impacte significatiu en l'alliberació total de volum de calci.

### **Efectes dels inhibidors de les PDEs 3 i 4**

A l'hora de diferenciar l'efecte dels inhibidors de les diferents fosfodiesterases s'ha comparat l'efecte de la inhibició de dues PDEs, en aquest cas la número 3 i la número 4, amb l'objectiu de mesurar l'impacte fisiològica d'una i l'altra. S'han extret els paràmetres dels *sparks* i s'ha comparat les distribucions dels dos grups per comprovar si provenen d'una mateixa. Com que les distribucions no seguien una distribució normal (comprovat mitjançant el Kolmogorov-Smirnov test) s'han comparat mitjançant el test de Wilcoxon,

S'han observat diferències en la morfologia dels *sparks* entre els dos fàrmacs: la durada és significativament més llarga en els miòcits tractats amb CIL que amb RO (Taula 31). Això, comporta que consegüentment en la constant de decaïment, que es presenta més lenta també amb CIL. Els dos fàrmacs inhibidors de les PDEs augmenten la duració i la massa respecte als experiments de control.

### **Efectes en la morfologia dels *sparks* sota els efectes del fàrmac l'estimulador dels $\beta$ -AR**

Comparant les dades dels inhibidors de PDE amb l'agonista  $\beta$ -adrenèrgic ISO és pot afirmar que RO i ISO són els que mantenen més la morfologia dels esdeveniments i que CIL promou una dinàmica més lenta amb una constants de decaïment més llarga, que es tradueix en més presència de calci al llarg de l'esdeveniment.

Taula 31. Paràmetres morfològics de la dinàmica dels *sparks*. Els test estadístic s'han realitzar comparant les condicions de Control amb els diferents fàrmacs per a cada paràmetre morfològic de la dinàmica de l'esdeveniment. El test estadístic utilitzat ha estat el test de Wilcoxon.

SPKs	CON	RO	CIL	ISO
<b>Amplitud</b> $\Delta F/F_0$	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01
<b>RoR</b> ( $\Delta F/F_0$ )/ms	0.004 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001
<b>FDHM</b> ms	45.38 ± 2.56	52.81 ± 3.37 *	66.71 ± 4.04 ***	61.20 ± 5.30 **
<b>Const. Decaïment</b> ms	67.40 ± 10.24	66.45 ± 5.38	83.98 ± 9.06 **	71.91 ± 5.58
<b>FWHM</b> $\mu\text{m}$	1.17 ± 0.03	1.23 ± 0.03	1.22 ± 0.04	1.20 ± 0.04
<b>Massa</b> a.u.	9.57 ± 1.01	16.56 ± 3.68 *	17.49 ± 2.61 **	16.55 ± 2.61 **

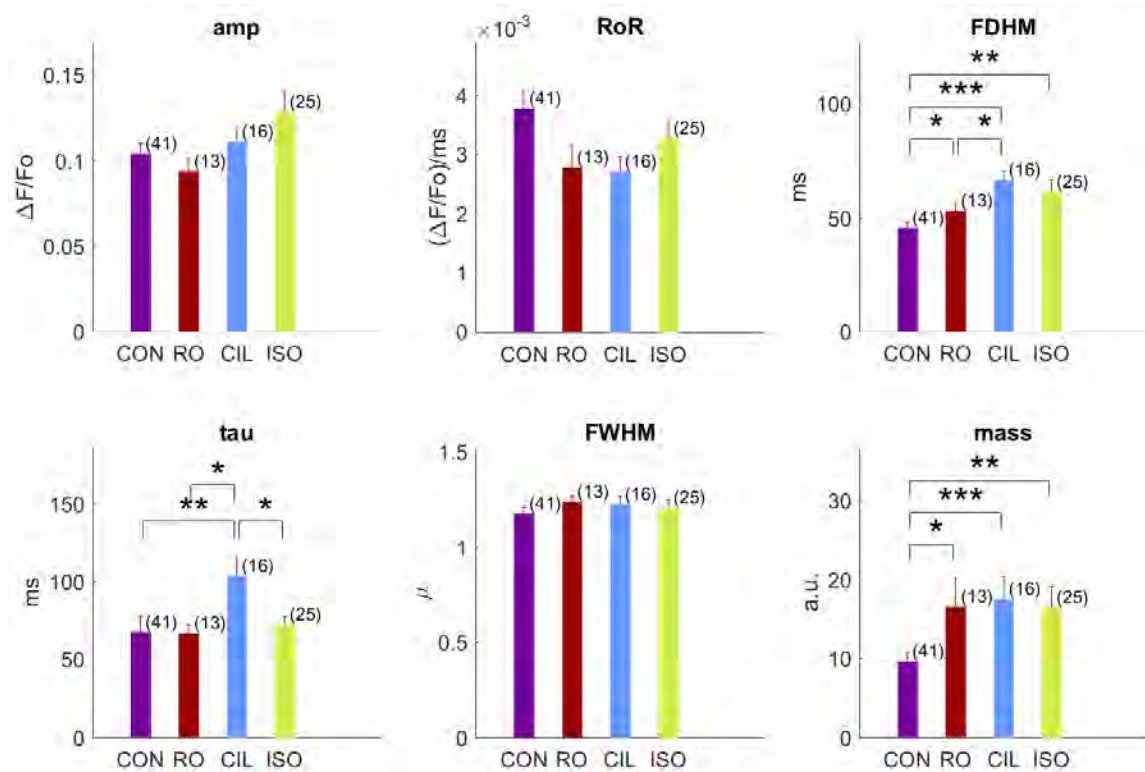


Figura 109. Paràmetres de la morfologia del senyal de calci dels *sparks* en les diferents condicions.

### 5.4.3 Activació i freqüències d'esdeveniments

A l'hora d'avaluar l'estat global de la cèl·lula es poden observar les freqüències de cada tipus d'alliberacions de calci que han tingut lloc en el miòcit. És per aquest motiu que s'ha quantificat la freqüència d'activacions, la de *sparks* i la de *waves*.

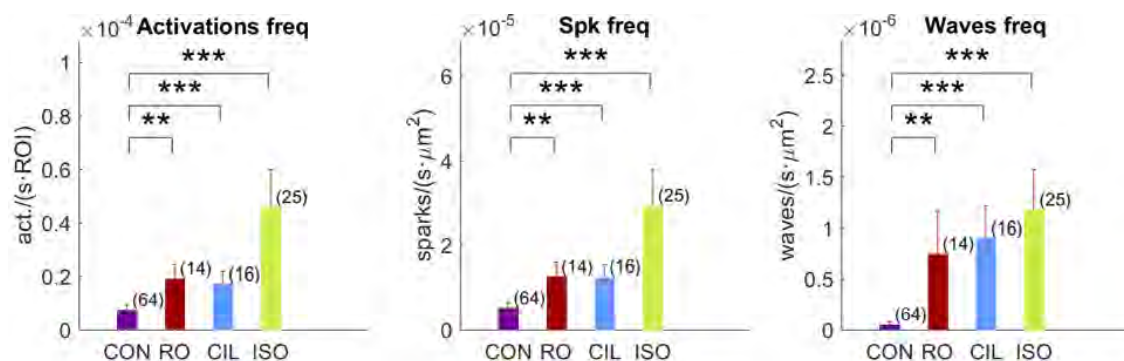


Figura 110. Comparativa de les freqüències d'esdeveniments utilitzant els diferents fàrmacs.

Taula 32. Freqüències d'activitat de calci donada una certa àrea.

FREQ. A.	Activacions #clustAct/ms	Sparks #nSpk/(ms·μm <sup>2</sup> )	Waves #waves/(ms·μm <sup>2</sup> )
CON	$7.17 \cdot 10^{-6} \pm 1.93 \cdot 10^{-6}$	$5.12 \cdot 10^{-6} \pm 1.30 \cdot 10^{-6}$	$0.48 \cdot 10^{-7} \pm 0.03 \cdot 10^{-7}$
RO	$18.84 \cdot 10^{-6} \pm 5.38 \cdot 10^{-6} **$	$12.54 \cdot 10^{-6} \pm 3.42 \cdot 10^{-6} **$	$7.42 \cdot 10^{-7} \pm 4.24 \cdot 10^{-7} **$
CIL	$17.05 \cdot 10^{-6} \pm 4.66 \cdot 10^{-6} ***$	$12.24 \cdot 10^{-6} \pm 3.12 \cdot 10^{-6} ***$	$8.99 \cdot 10^{-7} \pm 3.16 \cdot 10^{-7} ***$
ISO	$45.72 \cdot 10^{-6} \pm 14.03 \cdot 10^{-6} ***$	$29.33 \cdot 10^{-6} \pm 8.52 \cdot 10^{-6} ***$	$11.75 \cdot 10^{-7} \pm 3.99 \cdot 10^{-7} ***$

Com es pot observar en la Taula 32, el nombre d'esdeveniments per unitat de temps i àrea augmenta significativament amb qualsevol dels fàrmacs administrats. S'observa un augment més lleuger en el cas dels inhibidors de PDEs respecte als excitadors dels receptors β-AR.



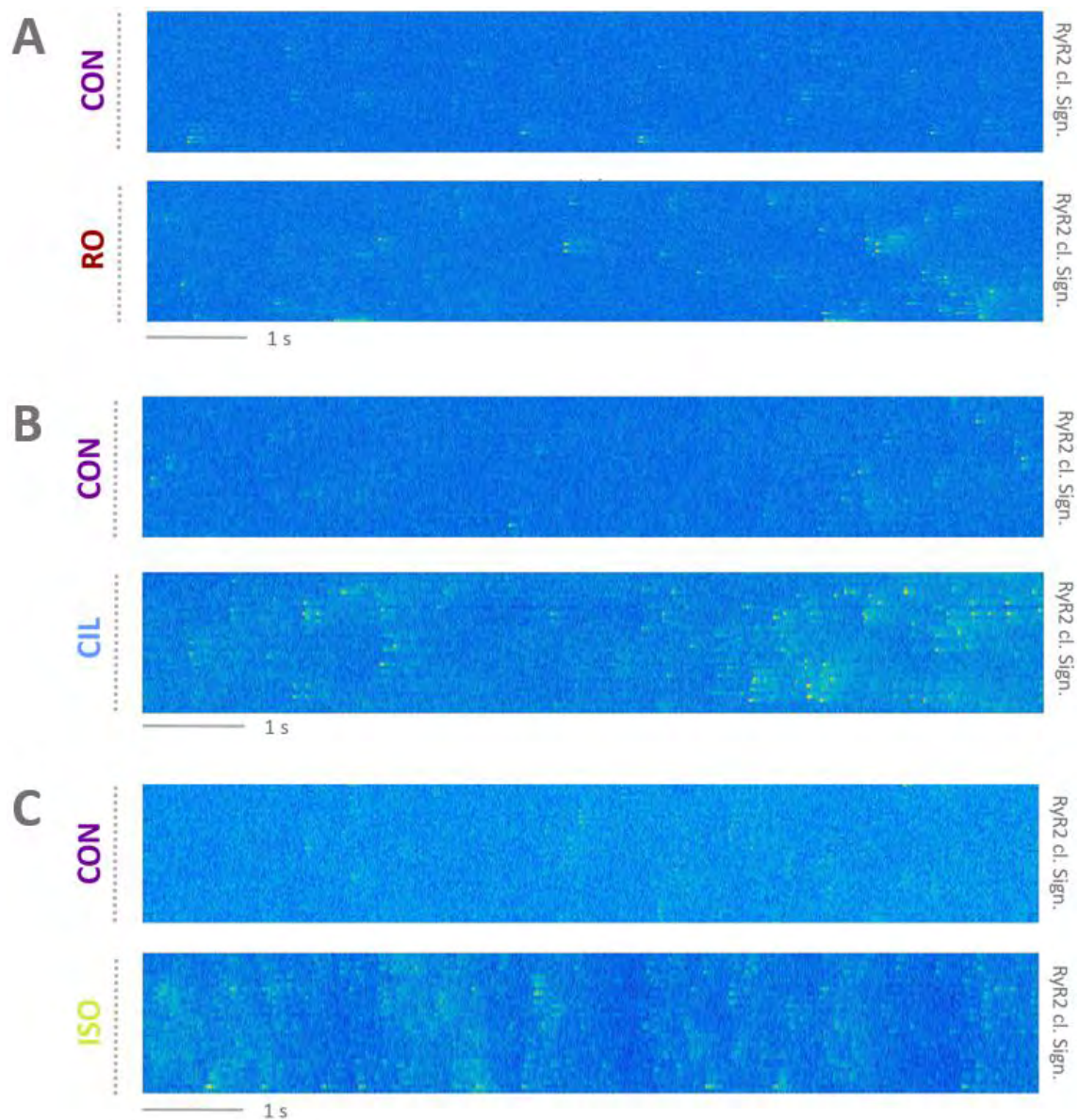


Figura 111. Freqüència d'activacions d'una mateixa cèl·lula en condicions de control i sota els efectes de: A) RO B) CIL C) ISO. En l'eix y de les imatges cada fila representa el senyal d'intensitat de calci d'un RyR2 clúster i en l'eix x l'evolució temporal en el temps.

## 5.5 SUBESTRUCTURA DE LES ACTIVACIONS EN ELS SPARKS

### 5.5.1 Sparks i nombre de clústers de RyR2s actius

A partir de l'agrupació d'activacions de RyR2 clústers en *sparks* s'ha obtingut el nombre total d'aquests. També s'ha mirat en quantes cèl·lules s'han produït i quins són els percentatges de *sparks* amb diferent nombre de RyR2 clústers activats al llarg dels registres.

S'ha comparat els nombres de cèl·lules (taula 33) que presenten *sparks* de 1, 2 i 3 clústers en cada condició amb l'estat de control i s'ha validat mitjançant el test  $\chi^2$ , en el qual s'ha observat que la condició que promou a que hi hagi un nombre més gran de cèl·lules amb *sparks* més grans és ISO. El p-valors obtinguts del test  $\chi^2$  són RO (p=0.91), CIL (p=0.86) i ISO (p=0.74).

Taula 33. Nombre total de *sparks* amb un número concret de RyR2 clústers activats dins del propi esdeveniments. El nombre que es presenta entre parèntesis fa referència al nombre de cèl·lules en que s'han observa aquest nombre de *sparks*.

# SPKs	RyRs 1	RyRs 2	RyRs 3
	n <sub>sparks</sub> (n <sub>cells</sub> )	n <sub>sparks</sub> (n <sub>cells</sub> )	n <sub>sparks</sub> (n <sub>cells</sub> )
CON (n <sub>cells</sub> =64)	467 (41)	53 (16)	11 (5)
RO (n <sub>cells</sub> =13)	268 (12)	60 (8)	4 (3)
CIL (n <sub>cells</sub> =19)	389 (18)	56 (12)	11 (7)
ISO (n <sub>cells</sub> =25)	714 (25)	161 (19)	60 (16)

Tot i així si s'observen els percentatges diversos dintre del grup de cèl·lules que han presentat activitat (Taula 34), per cada cèl·lula de control que presenta *sparks* de 1 RyRs, un 39% d'elles presenten *sparks* de 2 RyRs i un 12 % de 3 RyRs. En el cas de RO un 67% de les cèl·lules actives han tingut *sparks* de 2 RyRs, que és 1.75 vegades el percentatge que presenten les cèl·lules de control, i un 25% de 3 RyRs. Sota els efectes de CIL un 67% han tingut *sparks* de 2 RyRs i un 39% de 3 RyRs, que suposa un augment de més del doble que les cèl·lules de control. Per últim, amb el tractament ISO s'ha observat que un 76% de les cèl·lules actives presentaven *sparks* de 2 clústers i un 64% de 3 clústers.

Taula 34. Percentatges de cèl·lules amb activitat de 1, 2 i 3 clústers de RyR2. Les columnes en blanc mostren el percentatge del número de cèl·lules amb activitat entre el número cèl·lules totals. Les columnes en gris mostren el percentatge del número de cèl·lules amb activitat entre el número de cèl·lules que han presentat activitat.

% cells	RyRs 1	RyRs 2		RyRs 3	
	n <sub>cells1</sub> / n <sub>cells</sub>	n <sub>cells2</sub> /n <sub>cells</sub>	n <sub>cells2</sub> /n <sub>cells1</sub>	n <sub>cells3</sub> /n <sub>cells</sub>	n <sub>cells3</sub> /n <sub>cells1</sub>
CON (n <sub>cells</sub> =64)	64 %	25 %	39 %	8 %	12 %
RO (n <sub>cells</sub> =13)	92 %	61 %	67 %	23 %	25 %
CIL (n <sub>cells</sub> =19)	94 %	63 %	67 %	36 %	39 %
ISO (n <sub>cells</sub> =25)	100 %	76 %	76 %	64 %	64 %

Per tant, observant les cèl·lules que presenten activitat sota totes les condicions es veu que el percentatge de cèl·lules que han tingut *sparks* de 2 RyRs és de 1.75 a 2.2 vegades major que en el cas de control. En el cas del percentatge de cèl·lules que presenten *sparks* de 3 RyRs amb tots els fàrmacs

augmenta més de dues vegades el valor del percentatge respecte el del nombre de cèl·lules de control, arribant a ser 5.3 vegades superior amb ISO.

En cada registre d'una cèl·lula també s'ha registrat el percentatge de *sparks* en funció al nombre d'activacions de RyR2 clústers dintre d'aquests. Un nombre major de cèl·lules presenten activitat més gran sota les condicions dels fàrmacs. També s'ha volgut comprovar com es distribueix aquesta activitat al llarg del registre. A la taula 35 es mostra la mitjana dels percentatges del nombre de *sparks* de cada tipus que ha presentat cada cèl·lula.

Taula 35. Percentatge de *sparks* segons el nombre de RyRs activats per a cada registre sota diferents condicions fisiològiques. Els p-valors que es mostren és la comparació mitjançant un test de Wilcoxon dels valors de control en vers els diferents fàrmacs.

#RyR2 SPKs	1 RyR2 %	2 RyR2 %	>2 RyR2 %
CON	91.86 ± 1.96	6.03 ± 1.54	2.02 ± 1.27
RO	85.32 ± 3.80 *	13.12 ± 3.57 *	1.56 ± 0.98
CIL	85.08 ± 3.41 *	10.45 ± 3.15	4.46 ± 1.96 *
ISO	77.70 ± 3.74 ***	15.69 ± 2.59 **	6.60 ± 1.64 **

S'ha comprovat que la majoria (91%-71%) dels *sparks* provenen d'activacions d'un sol RyR. El percentatge de *sparks* de més d'un RyR2 clúster augmenta amb tots els fàrmacs. En el cas de els inhibidors de PDEs el percentatge de *sparks* de 1 RyR2 clúster modula de 91.86% en Control a 85% tant per RO (p=0.036) com per CIL (p=0.031). En el cas del fàrmac estimulador dels receptors β-AR, ISO, un 77.70% (p<0.001). Dels *sparks* de 2 RyR2 clústers observem que amb els inhibidors de PDEs el percentatge de *sparks* de 2 RyR2 clústers en les cèl·lules augmenta pràcticament el doble respecte el que s'observa en control, CIL (p=0.171) i RO (p=0.042). Per altra banda en el cas de ISO arriba quasi a un 16% (p=0.002). Per últim, en el cas de *sparks* de més de 2 RyR2 clústers RO manté el percentatge que s'observa en control i CIL el dobla (p=0.033), sota els efectes de ISO augmenta 3 vegades el percentatge observat en control (p<0.001).

Tenint en compte l'àrea de la regió de la cèl·lula seleccionada, s'han observat proporcions diferents entre RyR2 clústers activats i RyR2 clústers sense activitat, més concretament el percentatge de RyRs en aquesta àrea que s'activen en els casos de Control és d'un 9.11 ± 1.54 %, en comparació a aquesta situació sota els efectes dels diferents fàrmacs s'observa un augment de la proporció de RyR2 clústers actius, per tant hi ha àrea més gran de la cèl·lula amb activitat de calci. Per ordre de percentatge menys elevat a més elevat, primer es situen els fàrmacs inhibidors de las PDEs, essent la proporció de RyR2 clústers actius 1.4 vegades superior a la de controls, sent en CIL de 12.84 ± 2.42 % (p=0.094), seguit de RO que presenta un percentatge 1.6 vegades superior al de control, 14.69 ± 3.06 % (p=0.047). En el cas de l'estimulació dels receptors β-adrenèrgics la proporció augmenta 2.4 vegades l'observada en Control, essent per a ISO de 21.52 ± 4.18 % (p=0.005).

### Sparks de diferent nombre de clústers

Per acabar de complementar l'estudi, s'han comprovat els paràmetres de la morfologia dels *sparks* de diferent nombre de clústers. L'anàlisi comparativa amb el grup control només s'ha realitzat per a *sparks* de 1 o 2 RyR2 clústers ja que el volum d'*sparks* de 3 RyR2 clústers no és prou gran per a realitzar comparacions estadístiques. Si s'observa cada condició per separat es pot observar com els *sparks* de 2 RyR2 clústers són més grans, més llargs i més amples que es d'un sol RyR2 clúster. Els resultats de la comparació entre els paràmetres de la morfologia dels esdeveniments de 1 o 2 clústers es pot visualitzar en la figura 113 i en les taules 36 i 37. El paràmetre que té un increment més significatiu en tots els casos és el FWHM, tenint un creixement major sota les condicions de control.

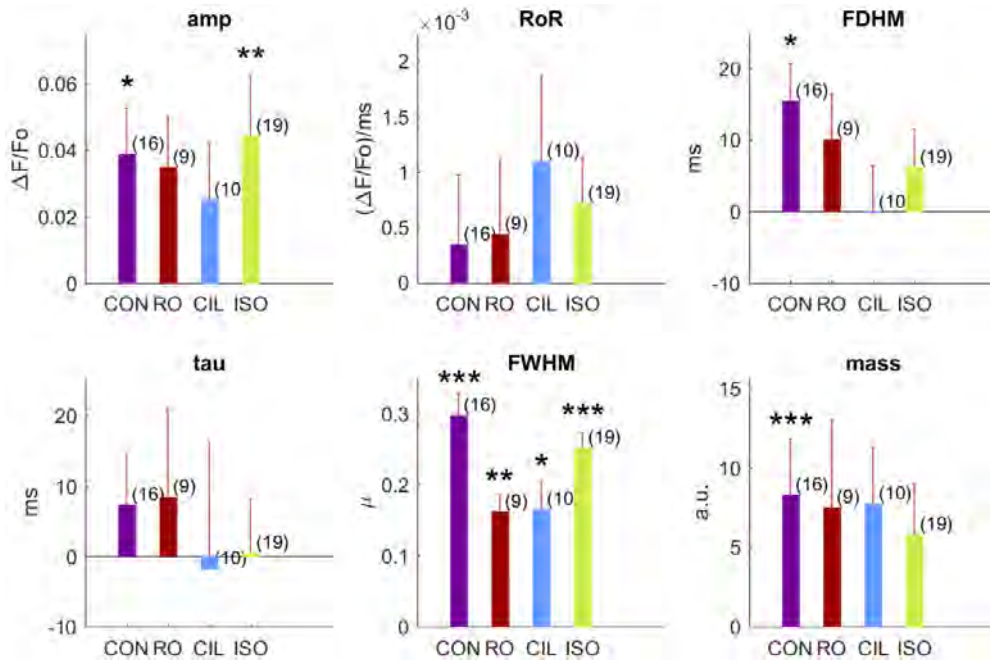


Figura 112. Representació la diferència entre els paràmetres morfològics dels *sparks* per a 1 i 2 RyRs, Cada barra representa el valor dels *sparks* de 2 RyRs menys el valor dels sparks de 1 RyRs per a cada cèl·lula (Ex.  $amp_{2RyRs} - amp_{1RyRs}$  = barra amp condició). Els p-valors representats indiquen si la diferència és estadísticament significativa utilitzant un test de Wilcoxon.

Taula 36. Paràmetres de la morfologia dels *sparks* de 1 i de 2 RyR2 clústers. El test estadístic emprat per comparar els valors obtinguts en *sparks* d'un clúster i de dos clústers ha estat el test de Wilcoxon, ja que les dades no segueixen una distribució normal segons els test de Kolmogorov-Smirnov. Els p-valors es mostren amb l'asterisc i representen la comparació dels valors dels *sparks* d'un clúster contra els *sparks* de dos clústers. (1)

	amp1	amp2	RoR1	RoR2	FDHM1	FDHM2
	$\Delta F/F_0$	$\Delta F/F_0$	$(\Delta F/F_0)/s$	$(\Delta F/F_0)/s$	ms	ms
CON	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01 *	36.38 ± 3.04	39.80 ± 6.10	44.37 ± 2.40	59.77 ± 5.03 *
RO	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.02	27.03 ± 3.50	31.39 ± 6.71	50.46 ± 3.28	60.49 ± 6.31
CIL	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02	26.21 ± 2.51	36.40 ± 7.71	64.45 ± 3.66	65.90 ± 6.48
ISO	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.02 **	30.75 ± 7.21	37.87 ± 4.09	58.26 ± 1.28	64.34 ± 5.40

Taula 37. Paràmetres de la morfologia dels *sparks* de 1 i de 2 RyR2 clústers. (2)

	<b>tau1</b>	<b>tau2</b>	<b>FWHM1</b>	<b>FWHM2</b>	<b>mass1</b>	<b>mass2</b>
	ms	ms	µm	µm	a.u.	a.u.
<b>CON</b>	66.97 ± 10.10	74.27 ± 7.04	1.13 ± 0.04	1.43 ± 0.03 ***	9.05 ± 0.98	17.34 ± 3.39 **
<b>RO</b>	66.06 ± 5.46	74.49 ± 12.64	1.20 ± 0.04	1.36 ± 0.024 **	15.13 ± 3.72	22.64 ± 5.49
<b>CIL</b>	81.51 ± 8.20	82.80 ± 8.26	1.16 ± 0.04	1.33 ± 0.04 *	15.43 ± 2.45	22.75 ± 3.15
<b>ISO</b>	73.30 ± 1.28	73.79 ± 7.72	1.12 ± 0.01	1.37 ± 0.02 ***	14.22 ± 0.47	19.98 ± 3.28

Posteriorment, s'ha comparat la morfologia dels *sparks* el condicions de control de 1 i 2 RyR2 clústers amb els *sparks* de 1 i 2 RyR2 clústers de les diferents condicions (Taula 38 i 39). Es pot apreciar que, per norma general, a excepció del RO, l'amplitud augmenta, el RoR s'alenteix i es presenta una constant de decaïment més lenta. Aquests factors repercuteixen en la durada de l'esdeveniment que es presenta més llarga. Finalment, aquests petits augments es veuen representats en la massa dels *sparks*, que augmenta amb totes les condicions. El paràmetre que més destaca sota les condicions de control en *sparks* de 2 RyR2 clústers és el FWHM.

Taula 38. Comparació dels *sparks* d'un i dos clústers de control contra les diferents condicions. El test estadístic emprat per comparar els valors obtinguts en *sparks* d'un clúster i de dos clústers ha estat el test de Wilcoxon, ja que les dades no segueixen una distribució normal segons els test de Kolmogorov-Smirnov. Els p-valors es mostren amb l'asterisc i representen la comparació dels valors dels *sparks* d'un clúster contra els *sparks* de dos clústers. (1)

	<b>amp1</b>	<b>amp2</b>	<b>RoR1</b>	<b>RoR2</b>	<b>FDHM1</b>	<b>FDHM2</b>
	ΔF/Fo	ΔF/Fo	(ΔF/Fo)/ms	(ΔF/Fo)/ms	ms	ms
<b>CON</b>	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01	36.38·10 <sup>-4</sup> ± 3.04·10 <sup>-4</sup>	39.80·10 <sup>-4</sup> ± 6.10·10 <sup>-4</sup>	44.37 ± 2.40	59.77 ± 5.03
<b>RO</b>	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.02	27.03·10 <sup>-4</sup> ± 3.50·10 <sup>-4</sup>	31.39·10 <sup>-4</sup> ± ±6.71·10 <sup>-4</sup>	50.46 ± 3.28	60.49 ± 6.31
<b>CIL</b>	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02	26.21·10 <sup>-4</sup> ± 2.51·10 <sup>-4</sup> *	36.40·10 <sup>-4</sup> ± 7.71·10 <sup>-4</sup>	64.45 ± 3.66 ***	65.90 ± 6.48
<b>ISO</b>	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.02	30.75·10 <sup>-4</sup> ± 7.21·10 <sup>-4</sup>	37.87·10 <sup>-4</sup> ± 4.09·10 <sup>-4</sup>	58.26 ± 1.28 **	64.34 ± 5.40

Taula 39. Comparació dels *sparks* d'un i dos clústers de control contra les diferents condicions. (2)

	<b>tau1</b>	<b>tau2</b>	<b>FWHM1</b>	<b>FWHM2</b>	<b>mass1</b>	<b>mass2</b>
	ms	ms	µm	µm	a.u.	a.u.
<b>CON</b>	66.97 ± 10.10	74.27 ± 7.04	1.13 ± 0.04	1.43 ± 0.03	9.05 ± 0.98	17.34 ± 3.39
<b>RO</b>	66.06 ± 5.46	74.49 ± 12.64	1.20 ± 0.04 *	1.36 ± 0.024 **	15.13 ± 3.72	22.64 ± 5.49
<b>CIL</b>	81.51 ± 8.20	82.80 ± 8.26	1.16 ± 0.04 **	1.33 ± 0.04 *	15.43 ± 2.45 **	22.75 ± 3.15 ***
<b>ISO</b>	73.30 ± 1.28	73.79 ± 7.72	1.12 ± 0.01	1.37 ± 0.02	14.22 ± 0.47 *	19.98 ± 3.28

## 5.6 COACTIVACIONS I MORFOGÈNESI D'ONES DE CALCI

### 5.6.1 Coactivacions de esdeveniments individuals

#### Temps i distància de coactivació

Tenint la informació d'aquests *sparks* que engloben més d'un RyR2 clúster s'ha volgut profunditzar en l'estudi de les propietats d'aquests esdeveniments. Sabent que tenen freqüències diferents al llarg dels registres de diferents cèl·lules, s'ha registrat el temps que tarda el primer RyR2 clúster a activar el segon RyR2 clúster dins d'un mateix *spark* varia en les diferents condicions. Amb tots els fàrmacs administrats, aquest temps augmenta respecte al control ( $8.98 \pm 0.39$  ms): RO ( $11.52 \pm 0.72$  ms;  $p=0.54$ ), CIL ( $12.57 \pm 0.55$  ms;  $p=0.25$ ) i ISO ( $11.11 \pm 0.29$  ms;  $p=0.27$ ).

Un altre paràmetre que s'ha quantificat de les coactivacions és en quants casos l'esdeveniment tenia lloc en la mateixa línia Z (SZ) o en diferents línies Z (DZ). Tal i com emmarca la taula 40 no s'observen diferències significatives entre els fàrmacs, a voltant del 70-80% de les activacions d'un segon clúster en un mateix *spark* tenen lloc en la mateixa línia Z. Les distàncies entre activacions de diferents RyRs coincideixen amb les observades entre veïns més propers en la mateixa línia Z i en diferent línia Z.

Taula 40. Salts d'activitat entre línies Z. SZ indica que l'activitat s'ha donat en la mateixa línia Z, DZ indica que l'activitat ha traspassat a la línia Z veïna. Indica els percentatges de salts d'activitat en els diferents casos i la distància entre aquests.

Línies Z	SZ %	DZ %	Dist. SZ $\mu\text{m}$	Dist. DZ $\mu\text{m}$
CON	78.13	21.87	$0.79 \pm 0.03$	$1.88 \pm 0.07$
RO	70.04	29.96	$0.83 \pm 0.02$	$1.89 \pm 0.06$
CIL	68.47	31.53	$0.74 \pm 0.04$	$1.90 \pm 0.07$
ISO	84.92	15.08	$0.73 \pm 0.02$	$1.91 \pm 0.06$

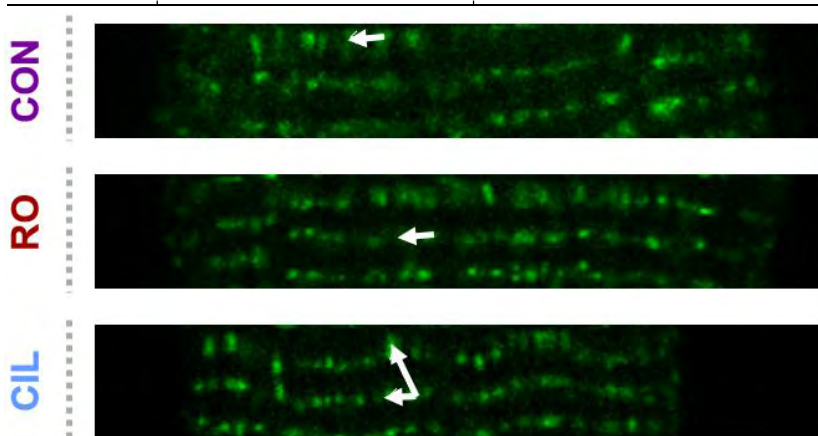


Figura 113. Exemples de trajectòries en experiments de CON, RO i CIL. Les trajectòries que es donen més vegades per norma general són les que transcorren entre RyR2 clústers veïns.

## Coactivació de parelles de RyR2 clústers

Seguint la línia d'estudi dels *sparks* en els que s'hi ha involucrat més d'un clúster, s'ha quantificat la freqüència de coactivacions de parelles de RyR2 clústers dels registres de la cèl·lula. Aquesta freqüència de coactivacion es un indicador de punts calents, o punts de més activitat, de la cèl·lula i les distàncies entre ells.

En la taula 41 es mostren les freqüències de coactivacions de parelles de RyRs de cada cèl·lula i el nombre de cèl·lules en les que s'han donat coactivacions. S'ha realitzat la comparació amb els valors de les parelles que s'han coactivat un cop ja que no es tenen suficients dades com per a tenir poder estadístic per determinar si el que s'observa amb un nombre major de coactivacions és fruit de l'atzar o són canvis fisiològics reals. Amb aquestes dades s'ha vist que els fàrmacs inhibidors de les PDEs no augmenten significativament la freqüència d'una coactivació però s'observen menys parelles amb dues coactivacions (taula 38, 2 coact.), per últim si que s'observen parelles amb 3 coactivacions que en situacions de control no se n'observen. El canvi més rellevant és que les parelles que es coactiven un cop sota els efectes de CIL estan a una distància més gran que les de control. Per altra banda, el fàrmacs excitador dels receptors  $\beta$ -adrenèrgics sí que augmenta la freqüència de 1 coactivació significativament, i també s'observa aquesta tendència per a dues i tres coactivacions. Com observem amb CIL, amb ISO les parelles de RyR2 clústers coactivades un cop es situen a una distància major.

Taula 41. Coactivacions i fàrmacs. En la primera part de la taula es mostra la freqüència d'activacions i el nombre de cèl·lules en parèntesis. En la segona part de la taula es mostren les distàncies mitjanes en les que es troben els clústers coactivats.

	<b>1 Coact.</b> n/ms (n <sub>cells</sub> )	<b>2 Coact.</b> n/ms (n <sub>cells</sub> )	<b>3 Coact.</b> n/ms (n <sub>cells</sub> )	<b>Dist. 1</b> $\mu\text{m}$	<b>Dist. 2</b> $\mu\text{m}$	<b>Dist. 3</b> $\mu\text{m}$
<b>CON</b>	0.13 $\pm$ 0.04 (17)	0.07 $\pm$ 0.02 (3)	0.00 $\pm$ 0.00 (0)	0.91 $\pm$ 0.07	1.22 $\pm$ 0.02 *	-
<b>RO</b>	0.14 $\pm$ 0.03 (10)	0.04 $\pm$ 0.01 (3)	0.04 $\pm$ 0.01 (3)	1.10 $\pm$ 0.10	0.83 $\pm$ 0.05	0.69 $\pm$ 0.02
<b>CIL</b>	0.20 $\pm$ 0.04 (13)	0.04 $\pm$ 0.01 (3)	0.03 $\pm$ 0.00 (1)	1.21 $\pm$ 0.09 *	0.84 $\pm$ 0.01	1.21 $\pm$ 0.00
<b>ISO</b>	0.30 $\pm$ 0.06 (20) *	0.09 $\pm$ 0.03 (12)	0.06 $\pm$ 0.02 (5)	1.13 $\pm$ 0.07 *	0.90 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.06

### 5.6.2 Propietats d'esdeveniments globals de les cèl·lules

Gràcies a la informació de la localització dels RyR2 clústers marcats amb GFP s'ha pogut extreure informació de les petites xarxes de connectivitat que venen donades pels esdeveniments produïts pels RyR2 clústers. En aquest cas en comptes de considerar els esdeveniments de la forma clàssica, com ara mirar la morfologia, s'han caracteritzat els esdeveniments a partir de les activacions i l'abast d'aquestes en tota la cèl·lula.

Els paràmetres escollits per caracteritzar aquests fenòmens d'alliberació de calci han estat:

- Fracció de RyR2 clústers activats
- Fracció de RyR2 clústers iniciadors
- Nombre mitjà d'activacions dels RyR2 clústers iniciadors
- Màxim camí de RyR2 clústers activats recorregut pels esdeveniments
- Nombre màxim d'activacions per RyR2 clúster
- Relació entre el camí més llarg d'un RyR2 clúster i el nombre d'activacions que hi ha hagut en aquest mateix clúster

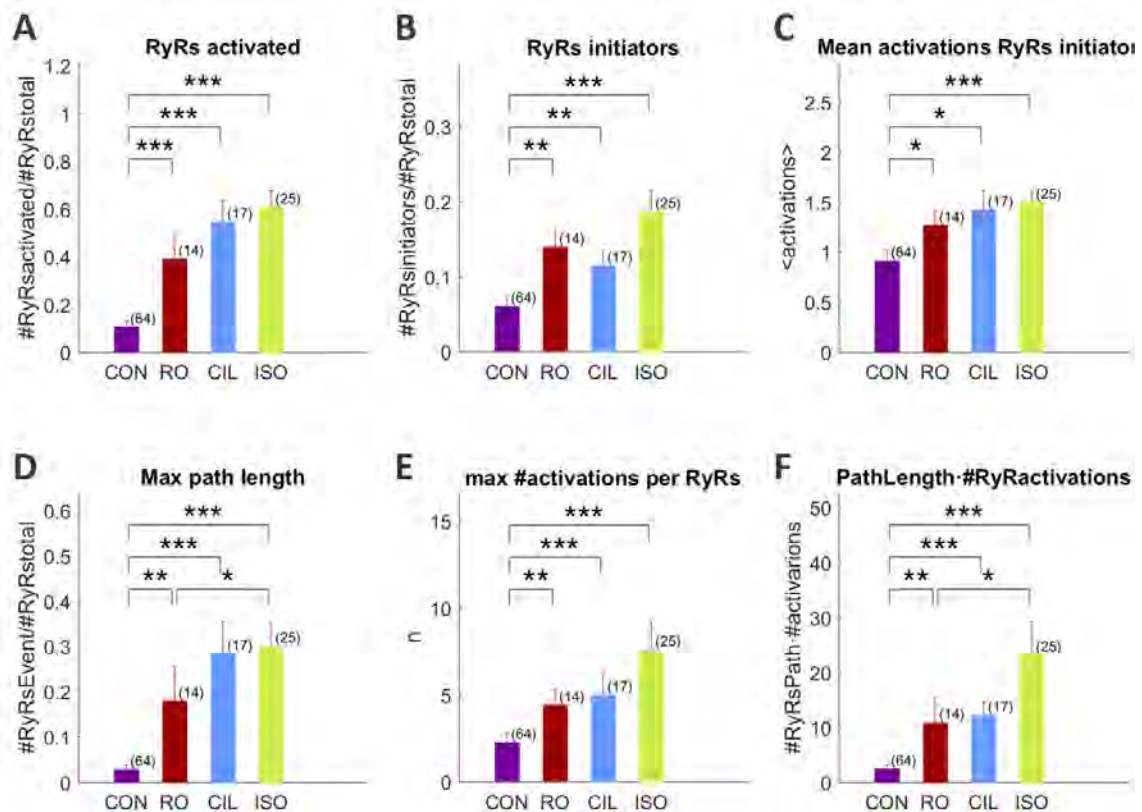


Figura 114. Trajectòries dels esdeveniments de calci. A) Fracció de RyR2 clústers activats. B) Fracció de RyR2 clústers iniciadors. C) Nombre mitjà d'activacions dels RyR2 clústers iniciadors. D) Màxim camí de RyR2 clústers activats recorregut pels esdeveniments. E) Nombre màxim d'activacions per RyR2 clúster. F) Relació entre el camí més llarg d'un RyR2 clúster i el nombre d'activacions que hi ha hagut en aquest mateix clúster.

En la figura 116A es pot observar que tots els fàrmacs aplicats a les cèl·lules augmenten el nombre de RyR2 clústers activats. En el cas el nombre de RyR2 clústers iniciadors també s'observa que hi ha una major proporció de RyR2 clústers que inicien esdeveniments de calci, per tant mostra que els RyR2 clústers activats també són potencialment més actius. En la figura 116C es mostra el nombre mitjà d'activacions dels RyR2 clústers iniciadors, que passa de ser 1 en l'estat basal de les cèl·lules a pràcticament 1.5 en la resta de condicions. El camí de RyR2 clústers que segueixen els esdeveniments també és més llarg en totes les condicions, passen a transcórrer del 2% dels nodes en el cas de control al 18% sota els efectes de RO, 28% amb CIL i el 30% amb ISO. El nombre màxim d'activacions per RyR2 clústers també augmenta sota els efectes de totes les condicions, essent 2.26 activacions per RyR2 clúster en control fins a 7.60 sota els efectes de ISO. L'últim paràmetre ens mostra la relació entre el camí més llarg que produeixen els RyR2 clústers i el nombre d'activacions que han tingut



(Path Length·#màxim d'activacions), essent aquesta relació un paràmetre per mesurar la perillositat d'aquestes activacions, ja que si un RyR2 clúster iniciador té un potencial més alt per activar a altres veïns i es tracta d'un RyR2 clúster molt actiu pot donar a lloc a més activacions i més grans. La relació entre el camí més llarg i el nombre d'activacions dels clústers també augmenta en totes les condicions però és més pronunciat sota els efectes de ISO.

El percentatges de RyR2 clústers activats per cèl·lula són majors sota els efectes de tots els fàrmacs però majoritàriament de CIL i ISO, com es pot observar en la Figura 117.

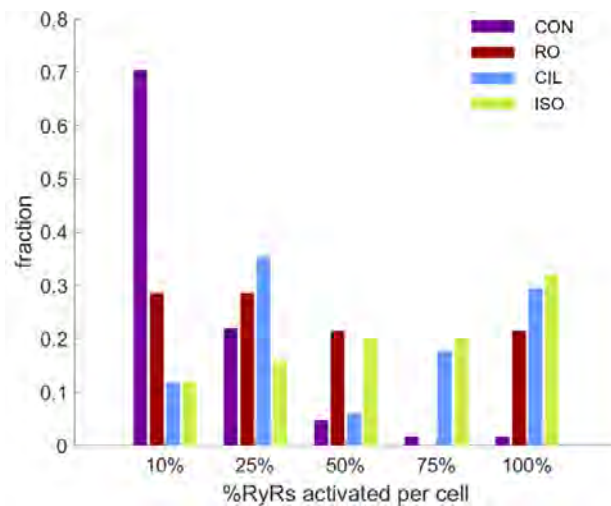


Figura 115. Histograma dels percentatges de RyR2 clústers respecte al total de clústers de la cèl·lula que s'han activat en cada condició.

Per acabar de profunditzar en l'anàlisi d'esdeveniments a partir de les activacions de RyR2 clústers s'ha mesurat els paràmetres referents a les waves. En la Figura 116A s'observa que els experiments sota els efectes de CIL, i l'estimulador  $\beta$ -adrenèrgic, ISO, presenten més waves (~50%) que sota els efectes de l'inhibidor de PDE4 RO (28%), tal i com s'ha observat en el percentatge de RyR2 clústers actius. El fàrmac que presenta un major nombre de RyR2 clústers per unitat de temps és ISO  $6.96 \pm 1.42$ , CIL  $4.14 \pm 0.70$  i RO  $3.76 \pm 0.74$ , figura 118B. També s'observa que ISO tendeix a tenir una velocitat de propagació de les waves més alta, però no és estadísticament significat.

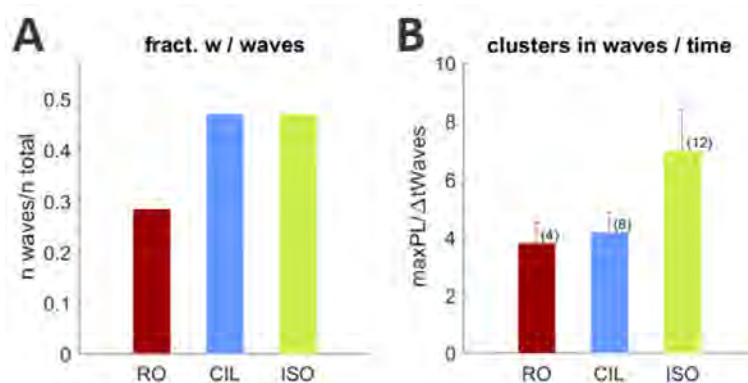


Figura 116. Anàlisi de les waves. A) Fracció d'experiments que presenten waves. B) Camí més llarg de clústers activats (clústers activats consecutivament) en la durada de la wave.

## 5.7 DISCUSSIÓ

---

### *Fosforilació en els RyR2 clústers*

S'ha observat que els inhibidors de PDEs, CIL i RO, mostren un grau més elevat de fosforilació respecte les cèl·lules de control, com ja ha estat descrit anteriorment en la literatura mitjançant altres tècniques com ara el Western Blot [131], [133]. Comparant els dos fàrmacs inhibidors de les PDEs no s'observen diferències significatives en el nivell de fosforilació. Per altra banda no s'observen canvis estructurals en els RyR2 clústers ni en la densitat d'ells un cop aplicats els tractaments a les cèl·lules, fet que ens indica que la fosforilació no sembla modular la distribució dels clústers.

### *Activitat espontània de calci*

S'ha observat que tots els fàrmacs augmenten la durada de la dinàmica de les activacions de RyR2 clústers, els esdeveniments més elementals de calci. La durada i la constant de decaïment són més llargues significativament respecte als experiments de control.

En els *sparks* s'observen efectes similars als observats en les activacions: durades més llargues i constants de decaïment més lentes, essent més notable en amb l'inhibidor de PDE3 en comparació a l'inhibidor de PDE4 ( $p < 0.05$ ). No s'observen canvis significatius ni en la ràtio d'elevació del calci ni en el FWHM. El paràmetre que engloba totes les petites modificacions en la dinàmica del calci és la massa dels esdeveniments, que en tots els casos és significativament més gran.

Els resultats de les imatges d'immunofluorescència ens indiquen que sota els efectes dels tots els fàrmacs els RyR2s estan més fosforilats, aquesta fosforilació dels canals augmenta la probabilitat d'obertura dels mateixos [32], fent que siguin més fàcilment excitables a concentracions més baixes de calci. Per tant, s'activen més canals RyR2s de dintre el clúster, provocant una durada més llarga de l'esdeveniment i una alliberació major de calci al citosol. A més, amb les dinàmiques més lentes d'alliberació de calci, queda més concentració de calci en el citosol que promou l'activació de RyR2 clústers veïns, facilitant-ne la fusió en esdeveniments globals.

### *Nombre de clústers en els sparks*

Tant els fàrmacs inhibidors de PDEs com els estimuladors dels  $\beta$ -AR presenten *sparks* de més de 2 RyR2 clústers augmenta de 1.75 (RO) a 2.2 (CIL) vegades. Els inhibidors de PDEs també han augmentat 2 (RO) i 3.25 (CIL) vegades el nombre de cèl·lules de amb esdeveniments de 3 RyR2 clústers. Els resultats obtinguts amb l'excitador dels receptors  $\beta$ -adrenèrgics ha estat de 5.3 superior al percentatge de cèl·lules amb activitat de 3 RyR2 clústers de control.

En aquestes mateixes cèl·lules durant els registres la distribució d'*sparks* ha variat al aplicar els fàrmacs, promovent que hi hagi un percentatge menor de *sparks* de 1 RyR2 clúster i augmentant els percentatges de 2 i 3 RyR2 clústers. La tendència és que hi hagi més esdeveniments més grans amb CIL, l'inhibidor de PDE3, aquest o bé per l'augment la fosforilació del RyR2, que augmenta la probabilitat d'obertura dels clústers i els fa més sensibles, o per altra banda podria provenir de l'augment de la fosforilació del reticle sarcoplasmàtic, promovent un augment del calci en el reticle que pot promoure l'alliberació espontània de calci [137], [138]. En el cas de l'excitador del receptor  $\beta$ -AR l'augment de *sparks* amb un nombre major de clústers és més significatiu que amb els fàrmacs inhibidors de les PDEs. Degut a que els agonistes dels  $\beta$  receptors estimulen la producció de cAMP per sobre de la capacitat de les PDEs de degradar-lo, l'augment de la fosforilació serà equivalent a utilitzar tots els inhibidors de PDEs simultàniament [44], per tant facilitarà encara més la coactivació de més RyR2 clústers veïns, produint *sparks* que engloben un nombre més gran de clústers.

Al comparar els *sparks* de 1 i 2 RyR2 clústers de control amb els *sparks* sota els efectes dels fàrmacs s'ha vist que majoritàriament s'augmenta la durada dels esdeveniments sota les diferents condicions. Aquest fet pot ser degut a que al estar més fosforilats els RyR2 dels clústers n'hi ha més canals que sobren i en conseqüència l'alliberació és més perllongada. En el cas del inhibidors de PDEs mostren una amplada de l'esdeveniment (FWHM) més petita per a esdeveniments de 2 RyR2 clústers respecte l'observat en condicions de control. Aquest fet pot ser degut a que també s'ha fosforilat el phospholamban del SERCA i això modifica la capacitat de reabsorció del calci citosòlic, que en aquest cas és més ràpida [45], [134].

#### *Activitat de calci descrita a partir dels RyR2 clústers*

S'ha estudiat l'activitat a partir dels RyR2 clústers aprofitant l'avantatge de poder visualitzar el calci citosòlic i els RyR2 clústers simultàniament. Això ha permès observar que tant el tractament amb RO, CIL com ISO augmenten el número d'activacions per RyR2 clúster, el nombre màxim d'activacions per RyR2 clúster y el recorregut màxim d'un esdeveniment, facilitant la introducció i la propagació de les ones de calci.

Per estimar la capacitat dels fàrmacs d'induir *waves* de calci, s'ha multiplicat el camí més llarg del clúster activador pel nombre d'activacions que té durant un registre. Utilitzant aquest índex de perillositat, s'observa que comparant les condicions CON, RO, CIL i ISO, aquest índex augmenta 20, 30 i 50 cops, coincidint amb l'augment de la freqüència de *waves* pels diferents tractaments, suggerint que tant el número d'activacions d'un clústers com el camí recorregut per l'esdeveniment (*path length*) modulen la inducció de *waves*. Per tant, sota totes les condicions s'ha observat que hi ha més activadors, s'activen més sovint i coactiven més RyR2 clústers veïns.

### *Diferències entre els fàrmacs que promouen la fosforilació*

En el context de l'activitat de calci espontània a través dels RyR2 clústers el fàrmac agonista dels receptors  $\beta$ -AR mostra uns efectes més pronunciats que els inhibidors de PDEs. Això és degut a que els estimuladors dels receptors  $\beta$ -AR estimulen la producció del cAMP per sobre de la capacitat dels PDEs de degradar el cAMP, fent un efecte com si s'utilitzessin els dos (o els 4) inhibidors de PDEs simultàniament [44].

En relació a la hipòtesis original, els inhibidors de PDEs s'ha vist en la literatura que difereix la localització i l'actuació lleugerament segons el tipus de PDE, PDE4 en el conjunt macromolecular del RyR2 [131], [132] i PDE3 té més afinitat pel conjunt macromolecular del SERCA [133], [134]. S'ha comprovat que ambdues tenen la capacitat de fosforil·lar el RyR2 en les imatges d'immunofluorescència. En aquest context s'ha observat que la inhibició de PDE3 allarga la duració i la reabsorció dels *sparks*. Considerant que la PDE3 està en un clúster macromolecular amb el SERCA, s'esperaria que la seva inhibició augmentés l'activitat de SERCA, facilitant la reabsorció del calci i reduint la durada del *spark*. En aquest sentit, s'ha mostrat que CIL augmenta el contingut del calci en el reticle sarcoplasmàtic [43], indicant que estimula l'acumulació de calci en el SR. Per tant, el fet de que la duració del *spark* augmenti, podria significar que el calci alliberat del RyR2 clúster és major que el que s'observa i que la duració augmenta perquè SERCA no és capaç de reabsorbir tot el calci alliberat. També podria significar que PDE3 normalment limita la via de senyalització per cAMP als clústers macromoleculars amb SERCA i que al inhibir el PDE3 es degrada la barrera del senyalització, permetent que la senyalització s'estengui a altres dianes com ara al RyR2. Per resoldre aquest problema seria necessari poder marcar les PDE3 i mesurar si la seva inhibició modifica els gradients locals de cAMP a prop dels RyR2.

Donades aquestes observacions, es pot afirmar que l'inhibidor de PDE3, CIL, respecte l'inhibidor de PDE4, RO, presenta unes propietats potencialment més arritmogèniques, ja que provoca *sparks* més llargs i amb massa més elevada. Aquestes propietats dels *sparks* promouen a que hi hagi més calci en el citosol i que s'activin més RyR2 clústers veïns durant els esdeveniments de calci, donant lloc a *sparks* amb un nombre major de clústers i *waves* que impliquen més RyR2 clústers.

# **PART III**

# **CONCLUSIONS**

Aquesta tesi tenia per objectiu proporcionar mètodes de processament d'imatge i tractament de dades per a extraure patrons de la fisiologia cel·lular dels miòcits cardíacs. A continuació es desglossarà les contribucions que s'han realitzat en els diferents estudis desenvolupats durant el desenvolupament de la mateixa.

## MÈTODES DE PROCESSAMENT D'IMATGES

---

S'ha pogut desenvolupar i dissenyar mètodes per a l'obtenció i l'anàlisi de imatges estàtiques i anàlisi de imatges de dinàmica de calci.

Entre ells, destaca un mètode per a la localització dels RyR2 clústers que mesura les seves característiques i reporta el grau de fosforilació.

També s'ha desenvolupat un mètode per a caracteritzar l'alliberació del calci a través dels RyR2 clústers que permet realitzar un anàlisi posterior dels *sparks* i les seves característiques tant morfològiques com espai-temporals a dins de la cèl·lula. Aquest anàlisi posterior dels *sparks* ha pogut ser traslladat a les imatges de cèl·lules humanes on no se'ls hi pot fer el marcatge genètic dels RyR2 clústers.

## FISIOLOGIA CEL·LULAR

---

Emprant els mètodes desenvolupats, s'ha obtingut informació rellevant de la fisiologia dels miòcits cardíacs.

Respecte als mètodes d'obtenció d'imatges, s'ha observat que l'exposició excessiva als làsers genera efectes nocius en les cèl·lules, provocant una elongació de la durada dels esdeveniments i un augment en la freqüència d'esdeveniments globals de calci, *waves*.

S'ha vist que la densitat de RyR2 clústers en la membrana és superior que en l'interior de les cèl·lules i s'ha observat que les distàncies entre RyR2 clústers veïns i entre línies Z és similar per a miòcits auriculars i ventriculars.

No s'han observat diferències en la morfologia dels esdeveniments de calci que tenen lloc en la membrana o en l'interior dels miòcits ventriculars. Tampoc s'han quantificat canvis morfològics significatius entre els *sparks* produïts en cèl·lules d'aurícula dreta o esquerra.

S'ha observat que un 91% dels *sparks* són produïts per l'activació d'un sol RyR2 clúster en l'estat basal de les cèl·lules, i el 8 % són produït per l'activació de dos RyR2 clústers. També, s'ha vist que al

augmentar el nombre de clústers d'un *spark* s'incrementa la seva amplitud, la durada, l'amplada i la massa.

El tractament amb fàrmacs estimuladors dels receptors  $\beta$ -adrenèrgics i amb els fàrmacs inhibidors de les PDEs produeix un augment de la fosforilació dels clústers de RyR2 en s2808. Amb aquest augment, també s'observa un increment de la duració dels esdeveniments i de la massa dels *sparks*. A més a més, s'ha quantificat un nombre major de RyR2 clústers activats per *spark*, facilitant l'activació de RyR2 clústers veïns.

S'ha observat que els pacients que pateixen fibril·lació auricular presenten una ràtio de fosforilació major en els RyR2 clústers. Tanmateix, els *sparks* presenten una massa superior que els *sparks* de cardio miòcits de pacients de control, suggerint que, sota les condicions d'arrítmia, els RyR2 clústers tendeixen a coactivar-se amb més freqüència, facilitant la seva fusió i la generació d'ones de calci arritmogèniques.

Finalment, s'ha observat que l'inhibidor de PDE3 (CIL) produeix una durada i una constant de decaïment més llargues en els *sparks* respecte l'inhibidor de PDE4 (RO), fet que promou a que hi hagi més calci en el citosol i recorreguts de clústers més llargs en esdeveniments globals de la cèl·lula.

Tots aquests avenços contribueixen a un millor enteniment dels mecanismes de l'alliberament de calci de RyR2 clústers individuals que promouen la fusió d'esdeveniments localitzats i, per tant, l'arritmogènesi.

## FUTURES LÍNIES D'INVESTIGACIÓ

---

Establir nous coneixements sempre crea una base més àmplia per generar noves incògnites i nous horitzons per explorar. En aquest camp encara hi ha moltes preguntes per respondre, però en base el que s'ha estudiat es dibuixen noves línies per seguir treballant.

Les eines desenvolupades per l'anàlisi dels RyR2 i l'alliberació espontània del calci permeten analitzar automàticament un gran nombre d'experiments i l'extracció de la freqüència i les propietats dels *sparks*. Seria molt interessant, en un futur, aplicar tècniques més avançades d'intel·ligència artificial i realitzar una detecció dels esdeveniments sense necessitat de la intervenció de l'usuari.

Respecte a la caracterització dels RyR2 clústers, seria adient realitzar experiments amb microscopia STED o aplicant tècniques de desconvolució per a realitzar una caracterització de la distribució 3D en la cèl·lula i analitzar més al detall la fosforilació dels RyR2 clústers.

També seria d'interès estudiar les diverses activacions d'un clúster de RyR2s dins d'un mateix *spark* que s'han observat utilitzant tècniques de LS, tant en estat basal com sota els fàrmacs que fosforilen els RyR2 clústers, per entendre millor els mecanismes moleculars subjacents.

Per últim, s'hauria d'aprofundir en l'anàlisi d'esdeveniments globals, tant *waves* com transitoris provinents de la estimulació, i en la relació amb les activacions dels RyR2 clústers sota les diferents condicions.



# LLISTAT DE PUBLICACIONS

## PUBLICACIONS EN REVISTES

---

1. Hiess, F., Detampel, P., Nolla-Colomer, C., Vallmitjana, A., Ganguly, A., Amrein, M., ter Keurs, H. E. D. J., Benítez, R., Hove-Madsen L. and Chen, S. R. W., "Dynamic and Irregular Distribution of Cardiac Ryanodine Receptor Clusters in the Periphery of Live Ventricular Myocytes" (2018) Biophysical Journal, 114:2, p343-354 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.026>

## PUBLICACIONS ENVIADES A REVISTES

---

1. Herraiz-Martínez, A., Tarifa, C., Jiménez-Sábado, V., Llach, A., Godoy-Marín, H., Colino, H., Nolla-Colomer, C., Casabella, S., Izquierdo-Castro, P., Benítez, I., Benítez, R., Roselló-Díez, E., Rodríguez-Font, E., Viñolas, X., Ciruela, F., Cinca, J., Leif Hove-Madsen, L., "Influence of sex on intracellular calcium homeostasis in patients with atrial fibrillation" (2021) Circulation research. Aceptat pendent de revisions menors.
2. Nolla-Colomer, C.; Vallmitjana, A.; Tarifa, C.; Jiménez-Sábado, V.; Casabella, S.; Herraiz-Martínez, A.; Llach, A.; Izquierdo-Castro, P.; Tauron, M.; Cinca, J.; Wayne Chen, S.R.; Benítez, R.; Hove-Madsen, L.; "β2-adrenergic stimulation potentiates spontaneous calcium release by increasing signal mass and co-activation of ryanodine receptor clusters" Acta Physiologica Enviat i pendent de revisió.

## PUBLICACIONS PENDENTS D'ENVIAR

---

1. Tarifa, C.; Vallmitjana, A.; Llach, A.; Herraiz, A.; Jiménez-Sábado, V.; Godoy-Marín, H.; Nolla-Colomer, C.; Cabello, N.; Ferrer-Gregori, A.; Ginel, A.; Viñolas, X.; Montiel, J.; Ciruela, F.; Benítez, R.; Cinca, J.; Hove-Madsen, L.; "Preferential subsarcolemmal calcium spark distribution potentiates arrhythmogenic electrical activity in patients with atrial fibrillation"

## PRESENTACIONES ORALS A CONGRESSOS

---

- PO1. Nolla-Colomer, C; Vallmitjana, A; Herrainz-Martínez, A.; Lage, H.; Chen, W.; Hove-Madsen, L.; Benitez, R. "Detection of Calcium Release from Individual RyR2 Clusters in Cardiomyocytes". (2020) Biophysical Journal. 118. 173a. doi: 10.1016/j.bpj.2019.11.1058.
- PO2. Nolla-Colomer, C; Tarifa, C; Llach, A.; Jiménez-Sábado, V.; Vallmitjana, A.; Casabella, S.; Colino, H.; Izquierdo, P.; Casellas, S.; Rodríguez-Font, J.; Wayne Chen, S.R.; Benítez, R.; Hove-Madsen, L.; "Pathological phosphorylation of the ryanodine receptor at s2808 increases the number of individual clusters activated per calcium spark and the calcium released per cluster". (2020) ESC Congress

## PUBLICACIONES A CONGRESSOS

---

- PC1. Vallmitjana, A; Nolla, C; Herrainz, A.; Hove-Madsen, L.; Benitez, R., "Multiscale Detection of Intracellular Protein Structures from Microscope Fluorescence Images" (2015) IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, Brooklyn, NY, April 16-19.
- PC2. Vallmitjana, A.; Nolla, C.; Herraiz-Martínez, A.; Hove-Madsen, L.; Benítez, R.; "Spatial localization of ryanodine receptors in human cardiac cells" (2015) EMBC 37th annual international conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Milan, Italy, August 25-29.
- PC3. Jiménez-Sábado, V.; Herraiz, A.; Nolla, C.; Tarifa, C.; Vallmitjana, A.; Benítez, R.; Cinca, J.; Hove-Madsen, L.; "Effects of atrial fibrillation on the distribution and phosphorylation of ryanodine receptor clusters at the sites Ser2808 and Ser2814 in human atrial myocytes" (2017) Cardiac Arrhythmia Copenhagen Meeting, Copenhagen, Denmark, May 31-June 2.
- PC4. Nolla-Colomer, C.; Vallmitjana, A.; Marchena, M.; Echebarria, B.; Herraiz-Martínez, A.; Hove-Madsen, L.; S. R. W. Chen; Benítez, R.; "Automatic segmentation of Línies Z in cardiac cells from microscope fluorescence images" (2017) EMBC 39th annual international conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Jeju Island, Korea, July 11-15.
- PC5. Jiménez-Sábado, V.; Nolla, C.; Chun, G.; Sheng, H.; Tarifa, C.; Herraiz, A.; Vallmitjana, A.; S.R.W. Chen; Benítez, R.; Tibbits, G.; Hove-Madsen, L.; "Excessive activation of beta-2 adrenergic receptors induces arrhythmic calcium oscillations and ryanodine receptor phosphorylation at ser2809 but not at ser2815" (2017) European Society of Cardiology Congress, Barcelona, Spain, August 26-30.
- PC6. Jiménez-Sábado, V.; Herraiz-Martínez, A.; Nolla-Colomer, C.; Tarifa, C.; Vallmitjana, A.; Montiel, J.; Benítez, R.; Cinca, J.; Hove-Madsen, L., "Inhibition of PDE3 but not PDE4 phosphodiesterases stimulate ryanodine receptor phosphorylation at Ser2808" (2017) CNIC Atrial Fibrillation meeting: from Mechanisms to Population Science, Madrid, Spain, November 3-4.

- PC7. Nolla-Colomer, C.; Vallmitjana, A.; Jiménez-Sábado, V.; Herraiz-Martínez, A.; Hove-Madsen, L.; Benítez, R. "Automatic detection of RyR2 clusters and their phosphorylation state in isolated cardiomyocytes" (2017) CNIC Atrial Fibrillation meeting: from Mechanisms to Population Science, Madrid, Spain, November 3-4.
- PC8. Herraiz-Martinez, A., Ferrero-Gregori, A., Llach, A., Jimenez-Sábado, V., Nolla-Colomer C., Benitez, R., Rosello, E., Cinca, J., Hove-Madsen, L., "P5364 Male and female sex are associated with different derangements of the intracellular calcium homeostasis in atrial fibrillation" (2018) European Heart Journal, Volume 39, Issue suppl\_1, 1 August 2018, ehy566.P5364, doi: 10.1093/eurheartj/ehy566.P5364
- PC9. Marchena, M.; Nolla-Colomer, C.; Hove-Madsen, L.; Benítez, R.; Echebarría, B., "Computational model of RyR activation dynamics in ventricular myocytes" (2018) "The Heart by Numbers: Integrating Theory, Computation and Experiment to Advance Cardiology Biophysics" thematic Meeting sponsored by the Biophysical society Berlin, September 4-7 of 2018.
- PC10. Nolla-Colomer, C.; Marimon, X.; Herrainz, A.; S. R. W. Chen; Hove-Madsen, L.; Benítez, R.; "Multi-scale characterization of calcium release patterns in cardiac physiology" (2018) Spanish Portuguese Meeting for Advanced Optical Microscopy, Granada, October 24-26.

## REFERÈNCIES

- [1] OMS, "The top 10 causes of death," 9 desember 2020, 2020. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [2] L. A. Venetucci, A. W. Trafford, and D. A. Eisner, "Increasing ryanodine receptor open probability alone does not produce arrhythmogenic calcium waves: Threshold sarcoplasmic reticulum calcium content is required," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 1, pp. 105–111, 2007.
- [3] S. Morimoto *et al.*, "Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca<sup>2+</sup> leak in mouse heart," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 390, no. 1, pp. 87–92, 2009.
- [4] X. Meng *et al.*, "Three-dimensional localization of serine 2808, a phosphorylation site in cardiac ryanodine receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 35, pp. 25929–25939, 2007.
- [5] M. D. McCauley and X. H. T. Wehrens, "Ryanodine receptor phosphorylation, Calcium/Calmodulin- dependent Protein Kinase II, and Life-threatening Ventricular Arrhythmias," vol. 21, no. 2, pp. 48–51, 2012.
- [6] W. Richter, M. Xie, C. Scheitrum, J. Krall, M. A. Movsesian, and M. Conti, "Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart," *Basic Res. Cardiol.*, vol. 106, no. 2, pp. 249–262, 2011.
- [7] S. Baudet, R. Shaoulian, and D. M. Bers, "Effects of thapsigargin and cyclopiazonic acid on twitch force and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content of rabbit ventricular muscle," *Circ. Res.*, vol. 73, no. 5, pp. 813–819, 1993.
- [8] D. Mika *et al.*, "Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes," *Cardiovasc. Res.*, vol. 100, no. 2, pp. 336–346, 2013.
- [9] C. E. Molina *et al.*, "Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 59, no. 24, pp. 2182–2190, 2012.
- [10] A. Llach *et al.*, "Abnormal calcium handling in atrial fibrillation is linked to up-regulation of adenosine A<sub>2A</sub> receptors," *Eur. Heart J.*, vol. 32, no. 6, pp. 721–729, 2011.
- [11] T. M. Hoffman, "Phosphodiesterase Inhibitors," *Hear. Fail. Child Young Adult From Bench to Bedside*, vol. 3, pp. 517–522, 2017.
- [12] S. Priori, "Inherited dysfunction of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Handling and Arrhythmogenesis," *Circ. Res.*, vol. 108, no. 7, pp. 871–883, 2012.
- [13] Q. Zhou *et al.*, "Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 8, pp. 1003–1009, 2011.

- [14] M. Yano, T. Yamamoto, Y. Ikeda, and M. Matsuzaki, "Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia," *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 3, pp. 43–52, 2006.
- [15] X. H. T. Wehrens, S. E. Lehnart, S. Reiken, J. A. Vest, A. Wronska, and A. R. Marks, "Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: A critical mediator of heart failure progression," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 3, pp. 511–518, 2006.
- [16] D. Lloyd-Jones *et al.*, "Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2010 Update," *Circulation*, vol. 121, no. 7, pp. 948–954, Feb. 2010.
- [17] "Instituto Nacional de Estadística." [Online]. Available: [www.ine.es](http://www.ine.es).
- [18] K. Huang and R. F. Murphy, "From Quantitative Microscopy to Automated Image Understanding," *J Biomed. Opt.*, vol. 9, no. 5, pp. 893–912, 2004.
- [19] "<https://analyticalscience.wiley.com/>," 2019. [Online]. Available: <https://analyticalscience.wiley.com/doi/10.1002/imaging.6720>.
- [20] A. Kan, "Automated Analysis of Time Lapse Microscopy Images," 2012.
- [21] P. Rajpurkar *et al.*, "Deep learning for chest radiograph diagnosis: A retrospective comparison of the CheXNeXt algorithm to practicing radiologists," *PLoS Med.*, vol. 15, no. 11, pp. 1–17, 2018.
- [22] J. M. Nerbonne and R. S. Kass, "Molecular physiology of cardiac repolarization," *Physiol. Rev.*, vol. 85, no. 4, pp. 1205–1253, 2005.
- [23] G. Olivetti *et al.*, "Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 28, no. 7, pp. 1463–1477, 1996.
- [24] M. D. Bootman, D. R. Higazi, S. Coombes, and H. L. Roderick, "Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 19, pp. 3915–3925, Oct. 2006.
- [25] Y. Chen-Izu *et al.*, "Three-dimensional distribution of ryanodine receptor clusters in cardiac myocytes," *Biophys. J.*, vol. 91, no. 1, pp. 1–13, 2006.
- [26] G. Santulli and A. Marks, "Essential Roles of Intracellular Calcium Release Channels in Muscle, Brain, Metabolism, and Aging," *Curr. Mol. Pharmacol.*, vol. 8, no. 2, pp. 206–222, 2015.
- [27] D. R. L. Scriven, P. Asghari, and E. D. W. Moore, "Microarchitecture of the dyad," *Cardiovasc. Res.*, vol. 98, no. 2, pp. 169–176, 2013.
- [28] K. Ondrias *et al.*, "Stabilization of Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Function by FK506-Binding Protein," *Cell*, vol. 77, pp. 513–523, 1994.

- [29] S. O. Marx, K. Ondrias, and A. R. Marks, "Coupled gating between individual skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channels (ryanodine receptors)," *Science (80-. )*, vol. 281, no. 5378, pp. 818–821, 1998.
- [30] A. Fabiato, "Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum," *Cell Physiology*, vol. 245, pp. 275–285, 1983.
- [31] M. J. B. and M. D. B. H. Llewelyn Roderick, "Calcium-Induced calcium release," p. R425, 2003.
- [32] M. Scoote and A. J. Williams, "The cardiac ryanodine receptor (calcium release channel): Emerging role in heart failure and arrhythmia pathogenesis," *Cardiovasc. Res.*, vol. 56, no. 3, pp. 359–372, 2002.
- [33] W. Peng *et al.*, "Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2," *Science (80-. )*, vol. 354, no. 6310, 2016.
- [34] V. Shusterman, C. F. McTiernan, A. Goldberg, S. Saba, G. Salama, and B. London, "Adrenergic stimulation promotes T-wave alternans and arrhythmia inducibility in a TNF- $\alpha$  genetic mouse model of congestive heart failure," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 298, no. 2, pp. 440–450, 2010.
- [35] S. M. Narayan, J. D. Bayer, G. Lalani, and N. A. Trayanova, "Action Potential Dynamics Explain Arrhythmic Vulnerability in Human Heart Failure. A Clinical and Modeling Study Implicating Abnormal Calcium Handling," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 52, no. 22, pp. 1782–1792, 2008.
- [36] A. R. Marks, "Calcium cycling proteins and heart failure : mechanisms and therapeutics Find the latest version : Review series Calcium cycling proteins and heart failure : mechanisms and therapeutics," vol. 123, no. 1, pp. 46–52, 2013.
- [37] J. Zhang *et al.*, "Non- $\beta$ -blocking R-carvedilol enantiomer suppresses Ca<sup>2+</sup> waves and stress-induced ventricular tachyarrhythmia without lowering heart rate or blood pressure," *Biochem. J.*, vol. 470, no. 2, pp. 233–242, 2015.
- [38] H. M. Leif *et al.*, "Suppression of ryanodine receptor function prolongs Ca<sup>2+</sup> release refractoriness and promotes cardiac alternans in intact hearts," *Biochem. J.*, vol. 473, no. 21, pp. 3951–3964, 2016.
- [39] A. P. Landstrom, D. Dobrev, and X. H. T. Wehrens, "Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias," *Circ. Res.*, vol. 120, no. 12, pp. 1969–1993, 2017.
- [40] G. Meissner, "Regulation of ryanodine receptor ion channels through posttranslational modifications," *Curr. Top. Membr.*, vol. 66, no. C, pp. 91–113, 2010.
- [41] B. Xiao *et al.*, "Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon  $\beta$ -adrenergic stimulation in normal and failing hearts," *Biochem. J.*, vol. 396, no. 1, pp. 7–16, 2006.

- [42] A. R. Soltis and J. J. Saucerman, "Synergy between CaMKII substrates and  $\beta$ -adrenergic signaling in regulation of cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling," *Biophys. J.*, vol. 99, no. 7, pp. 2038–2047, 2010.
- [43] O. E. Osadchii, "Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease," *Cardiovasc. Drugs Ther.*, vol. 21, no. 3, pp. 171–194, 2007.
- [44] G. Vandecasteele, F. Rochais, A. Abi-Gerges, and R. Fischmeister, "Functional localization of cAMP signalling in cardiac myocytes," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 34, no. 4, pp. 484–488, 2006.
- [45] T. M. Vinogradova *et al.*, "Basal Spontaneous Firing of Rabbit Sinoatrial Node Cells Is Regulated by Dual Activation of PDEs (Phosphodiesterases) 3 and 4," *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.*, vol. 11, no. 6, pp. 1–13, 2018.
- [46] B. A. Fertig and G. S. Baillie, "PDE4-Mediated cAMP Signalling," *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, vol. 5, no. 1, p. 8, 2018.
- [47] M. Movsesian, F. Ahmad, and E. Hirsch, "Functions of PDE3 Isoforms in Cardiac Muscle," *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, vol. 5, no. 1, p. 10, 2018.
- [48] I. Zahradník, S. Györke, and A. Zahradníková, "Calcium activation of ryanodine receptor channels - Reconciling RyR gating models with tetrameric channel structure," *J. Gen. Physiol.*, vol. 126, no. 5, pp. 515–527, 2005.
- [49] B. I. Iaparov, S. Y. Khamzin, A. S. Moskvina, and O. E. Solovyova, "Mathematical modeling shows the frequency of Ca<sup>2+</sup> sparks in cells depends on the ryanodine receptor's arrangement," *Procedia Comput. Sci.*, vol. 119, pp. 190–196, 2017.
- [50] W. Chen, G. Aistrup, J. Andrew Wasserstrom, and Y. Shiferaw, "A mathematical model of spontaneous calcium release in cardiac myocytes," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 300, no. 5, pp. 1794–1805, 2011.
- [51] G. S. B. Williams, A. C. Chikando, H. T. M. Tuan, E. A. Sobie, W. J. Lederer, and M. S. Jafri, "Dynamics of calcium sparks and calcium leak in the heart," *Biophys. J.*, vol. 101, no. 6, pp. 1287–1296, 2011.
- [52] G. D. Smith, J. E. Keizer, M. D. Stern, W. J. Lederer, and H. Cheng, "A simple numerical model of calcium spark formation and detection in cardiac myocytes," *Biophys. J.*, vol. 75, no. 1, pp. 15–32, 1998.
- [53] M. Marchena and B. Echebarria, "Computational Model of Calcium Signaling in Cardiac Atrial Cells at the Submicron Scale," *Front. Physiol.*, vol. 9, no. December, pp. 1–14, 2018.
- [54] E. A. Sobie, K. W. Duly, J. D. S. Cruz, W. J. Lederer, and M. S. Jafri, "Termination of cardiac Ca<sup>2+</sup> sparks: An investigative mathematical model of calcium-induced calcium release," *Biophys. J.*, vol. 83, no. 1, pp. 59–78, 2002.

- [55] M. Nivala, E. de Lange, R. Rovetti, and Z. Qu, "Computational modeling and numerical methods for spatiotemporal calcium cycling in ventricular myocytes," *Front. Physiol.*, vol. 3 MAY, no. May, pp. 1–12, 2012.
- [56] J. Wong *et al.*, "Nanoscale Distribution of Ryanodine Receptors and Caveolin-3 in Mouse Ventricular Myocytes: Dilation of T-Tubules near Junctions," *Biophys. J.*, vol. 104, no. 11, pp. L22–L24, 2013.
- [57] M. SCHAEFFER, E. V. ORSI, and D. WIDELock, "Applications of Immunofluorescence in Public Health Virology," *Bacteriol. Rev.*, vol. 28, no. 4, pp. 402–408, 1964.
- [58] T. Nagai, K. Ibata, E. Park, M. Kubota, and K. Mikoshiba, "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological ...," *Genetics*, vol. 20, pp. 1585–1588, 1989.
- [59] R. Jaimes, R. D. Walton, P. Pasdois, O. Bernus, I. R. Efimov, and M. W. Kay, "A technical review of optical mapping of intracellular calcium within myocardial tissue," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 310, no. 11, pp. H1388–H1401, 2016.
- [60] S. R. Adams, "How calcium indicators work," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 5, no. 3, 2010.
- [61] A. Minta, J. P. Y. Kao, and R. Y. Tsien, "Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 14, pp. 8171–8178, 1989.
- [62] J. T. Russell, "Imaging calcium signals in vivo: A powerful tool in physiology and pharmacology," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 163, no. 8, pp. 1605–1625, 2011.
- [63] R. Y. Tsien, "Tsien (1998) Green fluorescein protein .pdf," 1998.
- [64] O. Stepanenko, V. Verkhusha, I. Kuznetsova, V. Uversky, and K. Turoverov, "Fluorescent Proteins as Biomarkers and Biosensors: Throwing Color Lights on Molecular and Cellular Processes," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 9, no. 4, pp. 338–369, 2008.
- [65] M. Ikawa, K. Kominami, Y. Yoshimura, K. Tanaka, Y. Nishimune, and M. Okabe, "Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice," *Development, Growth & Differentiation*, vol. 37, no. 4, pp. 455–459, 1995.
- [66] D. A. Rubinson *et al.*, "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference," *Nat. Genet.*, vol. 33, no. 3, pp. 401–406, 2003.
- [67] J. Livet *et al.*, "Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system," *Nature*, vol. 450, no. November, 2007.
- [68] M. Minsky, "Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope," *Scanning*, vol. 10, no. 1, pp. 128–138, 1987.



- [69] "LEICA." [Online]. Available: [www.leica-microsystems.com/science-lab](http://www.leica-microsystems.com/science-lab).
- [70] J. A. Thorley, J. Pike, and J. Z. Rappoport, *Super-resolution Microscopy: A Comparison of Commercially Available Options*. Elsevier Inc., 2014.
- [71] S. W. Hell and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt. Lett.*, vol. 19, no. 11, p. 780, 1994.
- [72] E. Ambrose, "A surface contact microscope for the study of cell movements," *Nature*, vol. 178, no. 1053, p. 1956, 1956.
- [73] H. Cheng *et al.*, "Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: Theory and studies with an automatic detection method," *Biophys. J.*, vol. 76, no. 2, pp. 606–617, 1999.
- [74] M. A. Bray, N. A. Geisse, and K. K. Parker, "Multidimensional detection and analysis of Ca<sup>2+</sup> sparks in cardiac myocytes," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 12, pp. 4433–4443, 2007.
- [75] F. V. Wegner, M. Both, and R. H. A. Fink, "Automated detection of elementary calcium release events using the à trous wavelet transform," *Biophys. J.*, vol. 90, no. 6, pp. 2151–2163, 2006.
- [76] E. M. Steele and D. S. Steele, "Automated detection and analysis of Ca<sup>2+</sup> sparks in x-y image stacks using a thresholding algorithm implemented within the open-source image analysis platform ImageJ," *Biophys. J.*, vol. 106, no. 3, pp. 566–576, 2014.
- [77] R. C. Gonzalez, R. E. Woods, and S. L. Eddins, *Digital image processing using MATLAB*, Second Edi. .
- [78] T. Popovic, Nenad, Milijkovic, Nadica, Djordjevic, Olivera, Sekara, "Artifact cancellation using median filter, moving average filter, and fractional derivatives in biomedical signals," *Int. Conf. Fract. Differ. its Appl.*, no. January 2018, 2016.
- [79] S. Aja-Fernández, G. Vegas-Sánchez-Ferrero, M. Martín-Fernández, and C. Alberola-López, "Automatic noise estimation in images using local statistics. Additive and multiplicative cases," *Image Vis. Comput.*, vol. 27, no. 6, pp. 756–770, 2009.
- [80] R. Barnes, C. Lehman, and D. Mulla, "Priority-flood: An optimal depression-filling and watershed-labeling algorithm for digital elevation models," *Comput. Geosci.*, vol. 62, no. 2, pp. 117–127, 2014.
- [81] J. Cousty, G. Bertrand, L. Najman, and M. Couprie, "Watershed cuts: Minimum spanning forests and the drop of water principle," *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 31, no. 8, pp. 1362–1374, 2009.
- [82] C. Allne, J. Y. Audibert, M. Couprie, and R. Keriven, "Some links between extremum spanning forests, watersheds and min-cuts," *Image Vis. Comput.*, vol. 28, no. 10, pp. 1460–1471, 2010.

- [83] Y. L. Huang, C. W. Chung, T. Y. Hsieh, and Y. L. Jao, "Outline detection for the HEp-2 cell in indirect immunofluorescence images using watershed segmentation," *Proc. - IEEE Int. Conf. Sens. Networks, Ubiquitous, Trust. Comput.*, pp. 423–427, 2008.
- [84] D. Gómez, J. Yáñez, C. Guada, J. Tinguaro Rodríguez, J. Montero, and E. Zarrazola, "Fuzzy image segmentation based upon hierarchical clustering," *Knowledge-Based Syst.*, vol. 87, pp. 26–37, 2015.
- [85] V. Wiesmann, D. Franz, C. Held, C. Münzenmayer, R. Palmisano, and T. Wittenberg, "Review of free software tools for image analysis of fluorescence cell micrographs," *J. Microsc.*, vol. 257, no. 1, pp. 39–53, 2014.
- [86] M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães, and S. J. Ram, "Image processing with ImageJ," *Biophotonics Int.*, vol. 11, no. 7, pp. 36–43, 2005.
- [87] L. Kamensky *et al.*, "Improved structure, function and compatibility for cellprofiler: Modular high-throughput image analysis software," *Bioinformatics*, vol. 27, no. 8, pp. 1179–1180, 2011.
- [88] M. S. Vokes and A. E. Carpenter, "CellProfiler: Open-Source Software to Automatically Quantify Images," *Micros. Today*, pp. 38–39, 2008.
- [89] D. Laksameethanasan, R. Z. Tan, G. W. L. Toh, and L. H. Loo, "CellXpress: A fast and user-friendly software platform for profiling cellular phenotypes," *BMC Bioinformatics*, vol. 14, no. SUPPL16, p. S4, 2013.
- [90] F. de Chaumont *et al.*, "Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research," *Nat. Methods*, vol. 9, pp. 690–696, 2012.
- [91] M. McCormick, X. Liu, J. Jomier, C. Marion, and L. Ibanez, "Itk: Enabling reproducible research and open science," *Front. Neuroinform.*, vol. 8, no. FEB, pp. 1–11, 2014.
- [92] K. Pulli, A. Baksheev, K. Korniyakov, and V. Eruhimov, "Real-Time Computer Vision with OpenCV," *Commun. ACM*, vol. 55, no. 6, pp. 61–69, 2012.
- [93] J. D. Hunter, "Matplotlib: A 2D Graphics Environment," *Comput. Sci. Eng.*, vol. 9, no. 3, pp. 90–95, 2007.
- [94] E. Hebisch, E. Wagner, V. Westphal, J. J. Sieber, and S. E. Lehnart, "A protocol for registration and correction of multicolour STED superresolution images," *J. Microsc.*, vol. 267, no. 2, pp. 160–175, 2017.
- [95] C. Soeller and D. Baddeley, "Super-resolution imaging of EC coupling protein distribution in the heart," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 58, no. 1, pp. 32–40, 2013.
- [96] Q. Tian, L. Kaestner, L. Schröder, J. Guo, and P. Lipp, "An adaptation of astronomical image processing enables characterization and functional 3D mapping of individual sites of

- excitation-contraction coupling in rat cardiac muscle," *Elife*, vol. 6, pp. 1–24, 2017.
- [97] D. Ladd, A. Tilunaite, H. L. Roderick, C. Soeller, E. J. Crampin, and V. Rajagopal, "Assessing Cardiomyocyte Excitation-Contraction Coupling Site Detection From Live Cell Imaging Using a Structurally-Realistic Computational Model of Calcium Release," vol. 10, no. October, pp. 1–15, 2019.
- [98] T. M. D. Sheard *et al.*, "Three-dimensional and chemical mapping of intracellular signaling nanodomains in health and disease with enhanced expansion microscopy," *ACS Nano*, vol. 13, no. 2, pp. 2143–2157, 2019.
- [99] K. Weisshart, "The Basic Principle of Airyscanning The Basic Principle of Airyscanning," *Zeiss Microsc.*, p. 22, 2014.
- [100] G. Q. Zhang, H. Wei, J. Lu, P. Wong, and W. Shim, "Identification and Characterization of Calcium Sparks in Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, 2013.
- [101] T. M. Vinogradova, Y. Y. Zhou, V. Maltsev, A. Lyashkov, M. Stern, and E. G. Lakatta, "Rhythmic Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Releases during Diastolic Depolarization of Sinoatrial Pacemaker Cells Do Not Require Membrane Depolarization," *Circ. Res.*, vol. 94, no. 6, pp. 802–809, 2004.
- [102] E. Picht, A. V. Zima, L. A. Blatter, and D. M. Bers, "SparkMaster: Automated calcium spark analysis with ImageJ," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 293, no. 3, pp. 1073–1081, 2007.
- [103] M. A. Carneiro-Júnior *et al.*, "Effect of exercise training on Ca<sup>2+</sup> release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 47, no. 11, pp. 960–965, 2014.
- [104] T. H. Fischer *et al.*, "Sex-dependent alterations of Ca<sup>2+</sup> cycling in human cardiac hypertrophy and heart failure," *Europace*, vol. 18, no. 9, pp. 1440–1448, 2016.
- [105] K. Ellefsen, B. Settle, I. Parker, and I. Smith, "An algorithm for automated detection, localization and measurement of local calcium signals from camera-based imaging," *Cell Calcium*, vol. 56, no. 3, pp. 147–156, 2014.
- [106] S. Galice, Y. Xie, Y. Yang, D. Sato, and D. M. Bers, "Size matters: Ryanodine receptor cluster size affects arrhythmogenic sarcoplasmic reticulum calcium release," *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 7, no. 13, 2018.
- [107] Q. Tian *et al.*, "Large scale, unbiased analysis of elementary calcium signaling events in cardiac myocytes," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 135, no. July, pp. 79–89, 2019.
- [108] C. H. T. Kong, C. Soeller, and M. B. Cannell, "Increasing sensitivity of Ca<sup>2+</sup> spark detection in noisy images by application of a matched-filter object detection algorithm," *Biophys. J.*, vol. 95, no. 2, pp. 6016–6024, 2008.

- [109] F. Hiess *et al.*, "Distribution and function of cardiac ryanodine receptor clusters in live ventricular myocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 33, pp. 20477–20487, 2015.
- [110] "Leica Microsystems," 2019.
- [111] "ThermoFisher Scientific," 2018. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com>.
- [112] H. Cheng, W. J. Lederer, and M. B. Cannell, "Calcium sparks: Elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle," *Science (80-. )*, vol. 262, no. 5134, pp. 740–744, 1993.
- [113] H. Cheng and W. J. Lederer, "Calcium sparks," *Physiol. Rev.*, vol. 88, no. 4, pp. 1491–1545, 2008.
- [114] G. B. Airy, "On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture," *Trans. Cambridge Philos. Soc.*, vol. 5, no. 5, pp. 283–291, 1835.
- [115] M. Linkert *et al.*, "Metadata matters: access to image data in the real world.," *J. Cell Biol.*, vol. 189, no. 5, pp. 777–782, 2010.
- [116] A. Jezierska, C. Chau, J. Pesquet, and H. Talbot, "An EM approach for Poisson-Gaussian noise modeling," in *19th European Signal Processing Conference*, 2011, pp. 2244–2248.
- [117] F. Hiess *et al.*, "Dynamic and Irregular Distribution of RyR2 Clusters in the Periphery of Live Ventricular Myocytes," *Biophys. J.*, vol. 114, no. 2, pp. 343–354, 2018.
- [118] G. R. Ferrier, R. H. Smith, and S. E. Howlett, "Calcium sparks in mouse ventricular myocytes at physiological temperature," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 285, no. 4 54-4, pp. 1495–1505, 2003.
- [119] C. X. Santos, N. Anilkumar, M. Zhang, A. C. Brewer, and A. M. Shah, "Redox signaling in cardiac myocytes," *Free Radic Biol Med.*, vol. 50, no. 7, pp. 777–793, 2011.
- [120] T. Kushibiki, T. Hirasawa, S. Okawa, and M. Ishiara, "Blue Laser Irradiation Generates Intracellular Reactive Oxygen Species in Various Types of Cells," *Photomed. Lase Surg.*, vol. 31, no. 3, 2013.
- [121] A. C. Cave *et al.*, "NADPH Oxidases in Cardiovascular Health and Disease," *Antioxid Redox Signal*, vol. 8, no. 5–6, pp. 691–728, 2006.
- [122] T. Karu, L. Pyatibrat, and G. Kalendo, "Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro," *J. Photochem. Photobiol.*, vol. 27, no. 3, pp. 219–223, 1995.
- [123] M. J. Jou, S. B. Jou, H. M. Chen, C. H. Lin, and T. I. Peng, "Critical Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Formation in Visible Laser Irradiation-Induced Apoptosis in Rat Brain Astrocytes (RBA-1)," *J. Biomed. Sci.*, vol. 9, no. 6, pp. 507–516, 2002.
- [124] H. Dridi, A. Kushnir, R. Zalk, Q. Yuan, Z. Melville, and A. R. Marks, "Intracellular calcium leak in heart failure and atrial fibrillation: a unifying mechanism and therapeutic target," *Nat. Rev.*

*Cardiol.*, vol. 17, pp. 732–747, 2020.

- [125] C. E. Molina *et al.*, “Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 59, no. 24, pp. 2182–2190, 2012.
- [126] W. Chen *et al.*, “The Ryanodine Receptor Store Sensing Gate Controls Ca<sup>2+</sup> Waves and Ca<sup>2+</sup> Triggered Arrhythmias,” vol. 20, no. 2, pp. 184–192, 2015.
- [127] S. G. Priori *et al.*, “Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia,” *Circulation*, vol. 106, no. 1, pp. 69–74, 2002.
- [128] N. Voigt *et al.*, “Enhanced Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-leak and Increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Exchanger Function Underlie Delayed Afterdepolarizations in Patients with Chronic Atrial Fibrillation,” *Circulation*, vol. 125, no. 17, pp. 2059–2070, 2012.
- [129] A. J. Workman, “UKPMC Funders Group Author Manuscript Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation,” *Cardiovasc. Res.*, pp. 1–23, 2010.
- [130] Y. Wang *et al.*, “ $\beta_2$  adrenergic receptor activation governs cardiac repolarization and arrhythmogenesis in a Guinea pig model of heart failure,” *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–7, 2015.
- [131] S. E. Lehnart *et al.*, “Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias,” *Cell*, vol. 123, no. 1, pp. 25–35, 2005.
- [132] J. Leroy *et al.*, “Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel complex regulates Ca<sup>2+</sup> current and protects against ventricular arrhythmias in mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 7, pp. 2651–2661, 2011.
- [133] S. Beca *et al.*, “Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium atpase type 2a Signaling complexes in mouse heart,” *Circ. Res.*, vol. 112, no. 2, pp. 289–297, 2013.
- [134] F. Ahmad *et al.*, “Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 2 (SERCA2) activity by phosphodiesterase 3A (PDE3A) in human myocardium: Phosphorylation-dependent interaction of PDE3A1 with SERCA2,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 11, pp. 6763–6776, 2015.
- [135] Y. Li *et al.*, “Blunted cardiac beta-adrenergic response as an early indication of cardiac dysfunction in Duchenne muscular dystrophy,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 103, no. 1, pp. 60–71, 2014.
- [136] D. Lang *et al.*, “Arrhythmogenic remodeling of  $\beta_2$  versus  $\beta_1$  adrenergic signaling in the human failing heart,” *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.*, vol. 8, no. 2, pp. 409–419, 2015.
- [137] A. Fabiato, “Two kinds of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells,” *Adv Exp Med Biol.*, vol. 62, p. 311:245, 1992.
- [138] D. R. Laver, “Ca<sup>2+</sup> STORES REGULATE RYANODINE RECEPTOR Ca<sup>2+</sup> RELEASE CHANNELS

VIA LUMINAL AND CYTOSOLIC Ca<sup>2+</sup> SITES," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 34, no. 9, pp. 889–896, 2007.