

Importancia del mapeo óptico de cultivos de cardiomiocitos HL-1 en estudios electrofisiológicos

Importance of the optical mapping of HL-1 cardiomyocyte cultures in electrophysiological studies

Catalina Tobón^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-0578-329X>

Juan Pablo Ugarte² <https://orcid.org/0000-0001-8008-3528>

Laura Carolina Palacio¹ <https://orcid.org/0000-0002-6942-0375>

¹Universidad de Medellín, Grupo de Materiales Nanoestructurados y Biomodelación – MATBIOM. Medellín, Colombia.

²Universidad de San Buenaventura, Grupo de Investigación en Modelamiento y Simulación Computacional – GIMSC. Medellín, Colombia.

*Autor para la correspondencia. ctobon@udem.edu.co

RESUMEN

Introducción: El desarrollo de herramientas para investigar la actividad electrofisiológica cardíaca ha permitido profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos subyacentes a las arritmias cardíacas. Los sistemas de mapeo óptico constituyen una tecnología que responde a la necesidad de superar varios obstáculos en la experimentación.

Objetivo: Proporcionar una visión general de la importancia del mapeo óptico en cultivos celulares HL-1, en las investigaciones en electrofisiología cardíaca.

Métodos: Se realizó una revisión sobre los estudios electrofisiológicos que involucran la línea celular HL-1 utilizando la técnica de mapeo óptico.

Conclusiones: Los trabajos se caracterizan por la implementación de la técnica respecto a la tecnología de los equipos de mapeo, a la utilización de diferentes colorantes y al objetivo de la investigación. Están enfocados en el estudio de mecanismos arritmogénicos, procesos de

estiramiento mecánico o remodelación del tejido y en el análisis de nuevos biomateriales. Lo anterior, sustenta la relevancia del mapeo óptico en la investigación cardíaca.

Palabras clave: mapeo óptico; electrofisiología cardíaca; cultivos celulares HL-1.

ABSTRACT

Introduction: The development of tools to study cardiac electrophysiological activity has made it possible to broaden knowledge about the mechanisms underlying cardiac arrhythmias. Optical mapping systems constitute a technology that responds to the need to overcome several hurdles in experimentation.

Objective: Provide an overview of the importance of optical mapping in HL-1 cell cultures in cardiac electrophysiology research.

Methods: A review was conducted of electrophysiological studies involving the HL-1 cell line using the optical mapping technique.

Conclusions: The studies are characterized by implementation of the technique with respect to the technology of mapping equipment, the use of different colorants and the purpose of the research. They focus on the study of arrhythmogenic mechanisms, mechanical stretch processes or tissue remodeling as well as the analysis of new biomaterials. The above substantiates the relevance of optical mapping in cardiac research.

Keywords: optical mapping; cardiac electrophysiology; HL-1 cell cultures.

Recibido: 23/04/2020

Aceptado: 06/05/2020

Introducción

El estudio de las propiedades electrofisiológicas del corazón sano y enfermo proporciona información relevante sobre los mecanismos subyacentes de las arritmias cardíacas. Los sistemas de mapeo óptico responden a la necesidad de superar varios obstáculos en electrofisiología y de disponer de tecnología capaz de registrar el potencial de membrana en condiciones donde, por razones de escala o complejidad, es difícil o imposible. A través de la técnica de mapeo óptico se

han logrado importantes contribuciones a la comprensión del comportamiento de la electrofisiología cardiaca. La adquisición de información de potenciales de acción, ya sea por activación autónoma o estimulación eléctrica externa, con alta resolución espacio-temporal y alta relación señal a ruido,⁽¹⁾ ha potenciado el estudio de arritmias auriculares y ventriculares.^(2,3,4,5)

Para mejorar la comprensión de las arritmias es fundamental investigar las propiedades de las ondas de excitación que se generan en el corazón. Sin embargo, la experimentación con corazones enteros presenta limitaciones éticas, económicas y de complejidad. En este sentido, los cultivos celulares monocapa son una alternativa atractiva, con la cual se tiene control del ambiente físico-químico y de las condiciones fisiológicas, la replicación de experimentos es económica y no demanda las consideraciones éticas que los modelos animales requieren.⁽⁶⁾ Los cultivos de cardiomiocitos ha demostrado ser un modelo útil para estudiar, a través del mapeo óptico, las diferentes propiedades que expresan durante la propagación del potencial de acción,^(7,8,9) y los mecanismos subyacentes a las arritmias cardíacas.^(10,11,12,13,14)

Las células HL-1 pertenecen a una línea de cardiomiocitos ampliamente caracterizada, que pueden cultivarse para formar monocapas. Esta línea celular mantiene un genotipo y fenotipo diferenciado que incluye las características electrofisiológicas, morfológicas y farmacológicas de los cardiomiocitos auriculares adultos.⁽¹⁵⁾ Así, la línea celular HL-1 se ha convertido en un modelo ampliamente utilizado en el estudio de la electrofisiología cardiaca^(16,17,18) y los mecanismos arritmogénicos,^(10,11,12,14,19) Los desarrollos tecnológicos del mapeo óptico han permitido ampliar el conocimiento de estos mecanismos y mejorar las estrategias terapéuticas.^(2,20,21,22,23) Sin embargo, el mapeo de cultivos requiere un manejo especial, debido a que la estimulación eléctrica y el procedimiento de tinción pueden dañar fácilmente la integridad de las monocapas celulares. En el presente trabajo de revisión se repasan las características de la línea celular HL-1, los fundamentos detrás del mapeo óptico, los equipos involucrados y el protocolo de tinción y se describen los estudios que involucran mapeo óptico de células HL-1 y sus hallazgos más relevantes.

Métodos

Se realizó una búsqueda de artículos y memorias de eventos científicos, publicados en revistas indexadas en las bases de datos Pubmed, Scopus y Google Académico, de estudios electrofisiológicos que involucran la línea celular HL-1 utilizando la técnica de mapeo óptico, y

que hubiesen sido publicados entre los años 2005 y 2020, con las palabras clave *optical mapping*, *HL-1*, *cardiomyocyte cell line*. Se excluyeron los trabajos que implementaran sistemas de mapeo que no fueran ópticos para su estudio o que utilizaran otro tipo de cultivos celulares diferentes a la línea celular HL-1. Adicionalmente, se realizó una búsqueda de publicaciones científicas sobre las características de la línea celular HL-1 y los fundamentos del mapeo óptico.

Resultados

Cultivos de cardiomiocitos HL-1

Los cardiomiocitos HL-1 son una línea celular del músculo cardíaco del linaje del tumor de cardiomiocitos auriculares AT-1. Se obtienen a partir de la inmortalización de AT-1 aislados de ratones transgénicos, en los cuales la expresión del antígeno T del virus SV40 es controlada por el promotor del factor natriurético auricular. Las células HL-1 se contraen incluso después del pase en serie, manteniendo las propiedades morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas cardíacas diferenciadas.⁽¹⁷⁾ Los análisis basados en la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) han confirmado un patrón de expresión génica similar al de los cardiomiocitos auriculares adultos, incluida la expresión de la cadena pesada de la miosina-cardíaca, la actina-cardíaca y la conexina-43.⁽¹⁷⁾ Por lo que estas células son fenotípica y genotípicamente similares a los cardiomiocitos maduros, lo cual las convierte en un modelo experimental útil para estudiar la función cardíaca. Estas células expresan proteínas cardíacas, incluidos canales iónicos importantes, como canales de calcio tipo L y T, e isoformas maduras de proteínas contráctiles sarcoméricas. La corriente tardía rectificadora de potasio es la corriente externa más prominente en las células HL-1. Estas células demuestran ser muy similares a cardiomiocitos auriculares primarios respecto a sus propiedades electrofisiológicas. Al estar diferenciadas y ser altamente proliferativas (debido a su origen tumoral), son adecuadas para cultivos *in vitro*, pues permiten estudios sobre la regulación molecular y celular de la función cardíaca,^(15,16) y para evaluar la respuesta de los canales iónicos cardíacos.⁽²⁴⁾ Por lo tanto, las células HL-1 son la única línea celular de cardiomiocitos inmortales disponible que se divide continuamente y se contrae espontáneamente, manteniendo las características fenotípicas de cardiomiocitos adultos. Para mantener su fenotipo y actividad contráctil espontánea deben cultivarse en medio *Claycomb*,⁽¹⁷⁾ suplementado con norepinefrina y

ácido retinoico. Aproximadamente tres días después de cultivadas, las células HL-1 forman una monocapa bidimensional con actividad contráctil.

Principios del mapeo óptico

Durante un experimento de mapeo óptico típico, el cultivo celular en monocapa o el corazón entero (perfundido mediante un sistema *Langendorff*),⁽⁴⁾ se tiñe con un colorante fluorescente sensible al voltaje o al calcio. El colorante se excita con una fuente de luz con una longitud de onda correspondiente al espectro de absorción del colorante. Cuando el colorante regresa a su estado fundamental, emite fotones de longitud de onda más larga que la de la luz de excitación. El sistema óptico filtra los fotones emitidos y enfoca la luz en un fotodetector, que cuantifica la cantidad de luz fluorescente emitida para cada uno de sus múltiples píxeles.⁽²⁵⁾ Los datos se adquieren a una frecuencia de muestreo establecida, en forma de matrices de intensidad de fluorescencia.⁽²⁵⁾ Este procedimiento requiere condiciones de oscuridad.

Los componentes de un sistema de mapeo óptico (Fig. 1) incluyen:

1. *Colorantes fluorescentes*: contienen moléculas que se enlazan con la membrana celular y ante la variación del potencial, emiten luz a una determinada longitud de onda. Los colorantes sensibles a cambios de voltaje relacionan su fluorescencia con el voltaje transmembrana, mientras que la fluorescencia de los colorantes sensibles al calcio se corresponde con los transitorios de calcio.⁽²⁶⁾ Los colorantes de respuesta rápida se utilizan en electrofisiología cardíaca, debido a su capacidad para seguir cambios de voltaje en microsegundos.⁽¹⁾
2. *Fuente de luz*: las fuentes de tungsteno-halógeno emiten un espectro de luz suave y continuo y es fácilmente aplicable a áreas reducidas. Por otro lado, la luz láser y los diodos de emisión de luz (LED) ofrecen una alternativa más estable, fácil de emplear y económica, con una demanda de potencia más baja y un amplio rango de longitudes de onda.⁽¹⁾ Una luz estable permite obtener una relación señal/ruido elevada.^(1,25)
3. *Fotodetector*: detectan la luz emitida por el colorante. Considerando la baja intensidad de la señal y la alta velocidad de propagación de las ondas eléctricas cardíacas, se requieren fotodetectores de alta velocidad y bajo ruido. Las tecnologías disponibles comprenden arreglos de fotodiodos, cámaras de tipo CCD (dispositivo de carga acoplada) o tipo CMOS

(semiconductor complementario de óxido metálico). Los CCD han demostrado mejor resolución espacio-temporal. Para señales de muy bajo nivel de luz, se ha desarrollado una nueva tecnología que proporciona mayor sensibilidad con poco ruido, los EMCCD (dispositivos de carga acoplada con multiplicación de electrones).

4. *Filtros ópticos*: bloquean la longitud de onda de excitación y dejan pasar las longitudes de onda de emisión del colorante antes de que la señal llegue al fotodetector, atenuando la luz de fondo.⁽¹⁾

Las modalidades de imagen óptica se basan en principios físicos de interacción luz-tejido dependiente de la longitud de onda, incluida la dispersión de fotones, la reflexión interna total, absorción, reflectancia y fluorescencia.⁽²⁵⁾

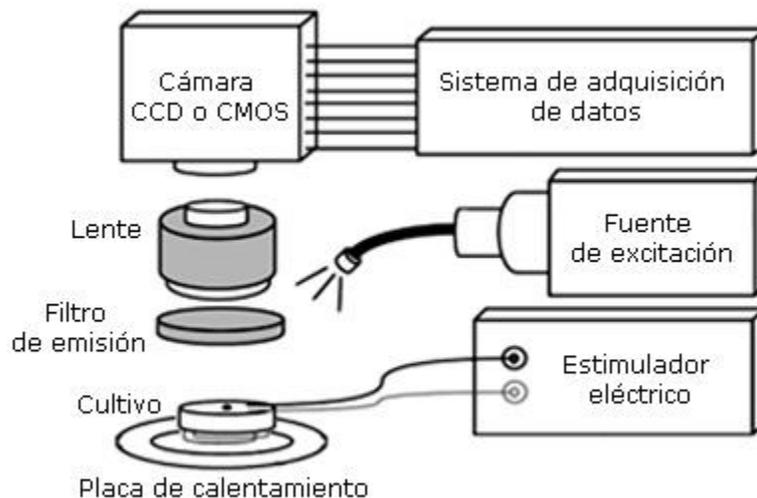


Fig. 1 - Esquema de componentes de un sistema de mapeo óptico.

Mapeo óptico en cultivos de cardiomiocitos HL-1

El objetivo principal del mapeo óptico cardiaco es proporcionar una mejor comprensión de la función electrofisiológica durante condiciones fisiológicas o patológicas. A continuación, se analizan los trabajos que han implementado el mapeo óptico de cardiomiocitos HL-1 para el estudio de las propiedades electrofisiológicas cardiacas.

Umapathy y otros⁽¹⁰⁾ en 2008, implementaron mapeo óptico en cultivos monocapa de células HL-1 con el objetivo de estudiar el origen de la fragmentación de las señales pseudoelectrogramas durante la formación de rotores y la fragmentación de ondas reentrantes. Para llevar a cabo el estudio cultivaron células HL-1 durante tres días hasta alcanzar confluencia y confirmar la actividad contráctil mediante microscopía. Aplicaron el colorante sensible al voltaje Di-4-ANEPPS durante cinco minutos, posteriormente mantuvieron el cultivo en solución Tyrode. Para el mapeo óptico, utilizaron un sistema de cámara CMOS (Ultima, BrainVision Inc.). Para mantener oscuridad total cubrieron con pantallas opacas la configuración de la parte frontal, que consiste en la preparación de la monocapa, el microscopio y la cámara. La preparación fue iluminada con luz verde (de 530 nm de longitud de onda) y la cámara de alta velocidad registró las señales de fluorescencia (luz roja de 600 nm) emitidas desde la monocapa a través de un filtro rojo. Realizaron 45 registros de mapeo óptico a 11 preparaciones de monocapa auricular, de los cuales, mediante procesamiento de las señales ópticas, obtuvieron electrogramas pseudobipolares. Observaron rotores estables en 32 de los 45 registros, donde los electrogramas no mostraron fragmentación en el núcleo del rotor. Sin embargo, en 19 casos donde el rotor fue migratorio, observaron la presencia de electrogramas fragmentados. En 13 de los 45 registros, hubo ruptura de onda o eventos de colisión de onda, donde 8 de 13 registros mostraron electrogramas fragmentados. Los resultados de este estudio sugieren que los electrogramas fragmentados se pueden registrar en sitios de rotores migratorios y ruptura de ondas, pero no en el núcleo de rotores estables. Estos resultados son relevantes para el avance de nuevas técnicas de ablación a través de detección y eliminación de zonas con electrogramas fragmentados.

Tsai y otros⁽¹¹⁾ en 2011, aplicaron mapeo óptico en cultivos monocapa de células HL-1 con el objetivo de investigar el efecto del estiramiento mecánico sobre las alternancias de la duración del potencial de acción (APD) y transitorios de calcio. Para esto, cultivaron cardiomiocitos HL-1 siguiendo el protocolo *Claycomb*, los cuales fueron sometidos a estimulación eléctrica con una forma de onda cuadrada bifásica y dos electrodos de platino paralelos para evitar la electrólisis. La frecuencia de estimulación fue de 10 Hz. La intensidad de estimulación creó un gradiente de voltaje de 1,0 V/cm. La transfección transitoria de los cardiomiocitos HL-1 la realizaron con el reactivo Lipofectamine 2000. Para generar el estiramiento mecánico, los cardiomiocitos se cultivaron en placas de membrana de silicona y se estiraron en una unidad de FX-4000 Flexercell® a 105 %, 110 % y 115 % de la longitud de reposo a una frecuencia de 1 Hz. Realizaron experimentos de mapeo

óptico dual de alta resolución para registrar simultáneamente el potencial de acción y transitorios de calcio. Las células fueron teñidas primero con el colorante sensible al voltaje RH237 durante 10 min y luego con el colorante sensible al calcio Rhod-2 durante 30 min. Para el registro utilizaron dos cámaras CMOS complementarias (MiCam Ultima, SciMedia®), cada una con resoluciones de 100 x 100 píxeles y a 1000 frames/s. La luz fluorescente de ambos colorantes se dividió mediante un divisor de fluorescencia, la luz de longitud de onda más larga (> 690 nm) para el registro del potencial de acción y la luz de longitud de onda más corta (585 nm) para el registro de transitorios de calcio. Las alternancias del APD fueron determinadas midiendo las diferencias de los APD locales en latidos consecutivos. Los resultados mostraron que la estimulación de alta frecuencia induce alternancias del APD y de los transitorios de calcio en el cultivo de cardiomiocitos. El estiramiento mecánico disminuyó significativamente los umbrales para las alternancias; mediante la reducción de la expresión de la adenosina trifosfatasa 2 (SERCA2) del retículo sarcoplásmico, la cinética de la recaptación de calcio fue más lenta, siendo esto responsable de la susceptibilidad a la alternancia. Estos resultados sugieren que el estiramiento mecánico aumenta la susceptibilidad a la alternancia en los cardiomiocitos auriculares, lo que explicaría la susceptibilidad a la fibrilación auricular en condiciones de estiramiento auricular, como la cardiopatía valvular mitral, la insuficiencia cardíaca e hipertensión. Por lo anterior, las alternancias del APD pueden ser abordados por tratamientos de sobreexpresión de SERCA2 en cardiomiocitos.

Climent y otros⁽⁵⁾ en 2014, presentaron un modelo *in vitro* de tejido cardíaco auricular que podría servir para estudiar los mecanismos de remodelación relacionados con la fibrilación auricular. El modelo de fibrilación auricular *in vitro* presentó diferentes grados de complejidad similares a los observados durante la fibrilación auricular con distintos grados de remodelación estructural. En este trabajo aplicaron mapeo óptico de los transitorios de calcio para caracterizar el grado de desorganización de la actividad reentrante en cultivos de células HL-1. Los cultivos celulares se dividieron en dos grupos: cultivados durante $6,1 \pm 1,3$ días (N = 10) y cultivados durante $11,7 \pm 0,5$ días (N = 8). Utilizaron el colorante para calcio Rhod-2, los cultivos celulares se iluminaron con una fuente de luz LED verde filtrada. La fluorescencia se registró con un dispositivo EMCCD (Evolve-128, Somos®), con un filtro de emisión (ET585) colocado frente a la lente. La cámara se enfocó manualmente para cubrir todo el plato con el número máximo de píxeles. El sistema fue controlado desde el software MATLAB® utilizando el software libre Micro-Manager. Los resultados del estudio sugieren que el número de rotores simultáneos está vinculado al tiempo y

grado de heterogeneidad de los cultivos celulares. Los cultivos de células HL-1 mostraron características electrofisiológicas que dependen de su grado de confluencia, lo cual se asemeja a los procesos con diferentes grados de remodelación estructural y, por tanto, de complejidad que ocurren durante la fibrilación auricular. Este modelo podría ser útil en los estudios del efecto de la remodelación sobre las dinámicas fibrilatorias y en la evaluación de nuevos fármacos antiarrítmicos.

El siguiente año, en 2015, *Climent* y otros⁽¹²⁾ analizaron las transformaciones en la dinámica del rotor posterior al proceso de remodelación del tejido, para lo cual, cultivaron células HL-1 de acuerdo con el protocolo *Claycomb*. Bajo estas condiciones, las células presentaron espontáneamente actividad fibrilatoria después de 53 ± 17 h. Para evaluar los efectos dependientes del tiempo sobre la complejidad de la fibrilación auricular, los cultivos celulares fueron divididos en dos grupos según el periodo de incubación posterior al inicio de la fibrilación, etapa temprana: $3,1 \pm 1,3$ días (N = 10), y etapa tardía: $9,7 \pm 0,5$ días (N = 8). Para cada grupo, adquirieron registros de mapeo óptico (4 s de duración) en condiciones basales y después de la administración de verapamil. Los cultivos celulares se tiñeron con el colorante Rhod-2 y se iluminaron con una fuente de luz LED (CBT-90-G), con un lente plano-convexo y un filtro de excitación verde. Se utilizaron dos fuentes de luz de este tipo para lograr una iluminación homogénea. La fluorescencia se registró con un dispositivo EMCCD, con un filtro de emisión adecuado para emisiones de Rhod-2, colocados frente a una cámara de alta velocidad (Navitar DO-2595). Compararon para los tiempos de cultivo temprano y tardío el grado de remodelación electrofisiológica y la ausencia de homogeneidad estructural, tanto en cultivos sin fibrilación como en condiciones de fibrilación. Obtuvieron mapas de fase al calcular la fase instantánea de los registros ópticos mediante la transformada de Hilbert, permitiendo identificar los núcleos de los rotores (puntos alrededor del cual giran). Observaron que la duración de la fibrilación modifica significativamente la complejidad de los patrones de propagación electrofisiológica de las células HL-1. En el caso de etapa temprana, observaron un solo rotor con frentes de onda relativamente regulares que cubrían la mayor parte del plato y pocas singularidades. Sin embargo, en los cultivos de etapa tardía se observaron varios frentes de onda pequeños y singularidades de fase, sin un claro rotor predominante. Estos resultados sugieren que las células HL-1 pueden reproducir características de la fibrilación auricular, como el remodelado electrofisiológico y la complejidad del

comportamiento electrofisiológico asociado con el tiempo de fibrilación, semejante a las condiciones de pacientes con fibrilación auricular persistente.

Suggs y otros⁽²⁷⁾ en 2015 evaluaron el efecto del gel de fibrina con PEG (polietilenglicol con amina reactiva homobifuncional) como matriz para cultivos de cardiomiocitos HL-1, sobre su función contráctil. Los cardiomiocitos fueron cultivados en la parte superior de hidrogeles de fibrina con PEG. Las propiedades de contractilidad de los cardiomiocitos fueron evaluadas a través de mapeo óptico, para lo cual utilizaron el colorante Fluo-4 sensible al calcio (excitación/emisión 494/516 nm), los geles se incubaron en Fluo-4 diluido durante 30 min. Suministraron estimulación eléctrica externa a través de un electrodo bipolar, aplicaron impulsos eléctricos monofásicos (10 V de amplitud, 200 ms de duración y frecuencia de 1 Hz) utilizando un estimulador de pulso aislado (Modelo 2100, A-M SystemsTM). Las secuencias de imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal, a intervalos de 195 ms durante 100 ciclos y 128 x 128 píxeles.

Los resultados mostraron que la proliferación y la expresión de conexinas-43 se mantienen cuando se cultiva sobre capas de fibrina con PEG. Las células mantuvieron su fenotipo contráctil y la razón de contracción fue influenciada por la concentración de fibrinógeno (Fig. 2). Estos hallazgos sugieren el potencial uso de capas de gel de fibrina con PEG en preparaciones con forma de lámina para la regeneración del miocardio.

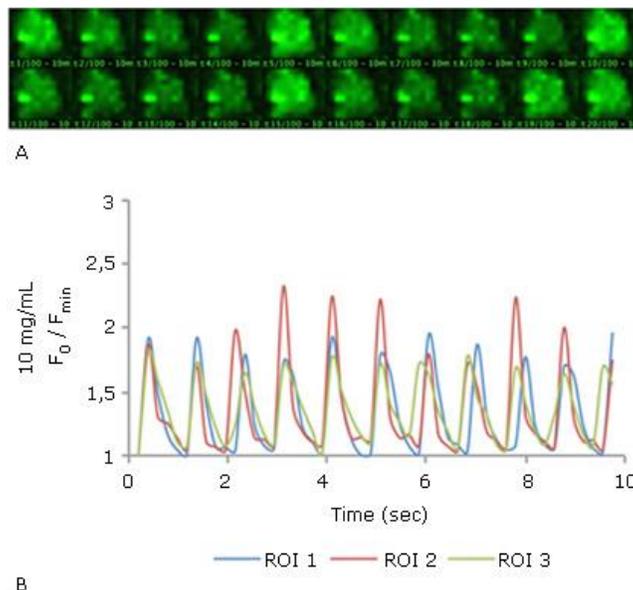


Fig. 2 - Seguimiento de calcio en cultivos de HL-1 en 10mg/ml de hidrogel gel de fibrina con PEG. **A.** Mapeo óptico usando Fluo-4. **B.** Tres registros temporales (ROI) de Intensidad de fluorescencia (F_0) normalizada a los valores de intensidad más bajos (F_{\min}).

Fuente: Suggs y otros,⁽²⁷⁾ con autorización de la editorial John Wiley and Sons.

Baheiraei y otros⁽²⁸⁾ en 2016, evaluaron la biocompatibilidad de películas electroactivas de poliuretano/siloxano preparados con células HL-1. Evaluaron si es posible mejorar la función de los cardiomiocitos a partir de tetrámeros de anilina electroactiva en la estructura. Para esto, estudiaron la capacidad de los cardiomiocitos de establecer conexiones eléctricas funcionales, observando la propagación en cultivos de HL-1 sobre el polímero mediante mapeo óptico. Las monocapas presentaron actividad contráctil para el día 3. Realizaron una evaluación electrofisiológica en células HL-1 sembradas sobre una película electroactiva. Los cultivos monocapa fueron cargados con el colorante para calcio Fluo-4 durante 20 min. Posteriormente, los transitorios de calcio se registraron con una cámara CMOS de alta resolución (Ultima L, SciMedia®) a 1 kHz de resolución temporal. La propagación de los transitorios de calcio fue generada por estimulación a 1,3 Hz mediante un electrodo extracelular ubicado lejos del campo de visión. Los resultados mostraron que el material electroactivo es biocompatible en términos de toxicidad celular y no altera las características electrofisiológicas intrínsecas de los cardiomiocitos HL-1. Adicionalmente, detectaron una mayor concentración de calcio intracelular en células sembradas sobre geles electroactivos, en comparación con grupos no conductores, lo que confirma que el hidrogel electroactivo es capaz de inducir un importante transitorio de calcio intracelular y mejorar las propiedades de transmisión de las señales eléctricas entre células. Estos resultados demuestran la potencial aplicabilidad de estos materiales en la ingeniería de tejidos cardiacos.

Gómez-Cid y otros⁽²⁹⁾ en 2016 evaluaron las propiedades funcionales de células HL-1 cultivadas sobre membranas flexibles PDMS (polidimetilsiloxano) como sustratos para parches cardiacos. Estas membranas son de polidimetilsiloxano y su flexibilidad se asemeja a las condiciones *in vivo* de la matriz extracelular. Tras confirmar actividad eléctrica del cultivo, midieron las propiedades de motilidad de las células HL-1 cuantificando el tiempo que necesitan las células para cerrar una lesión. Específicamente, después de alcanzar la confluencia total, realizaron una herida lineal en el cultivo celular con la punta de una pipeta, para que la conducción eléctrica se produjera solo en una cierta dirección. Después de inducir la herida, registraron la motilidad con un equipo de microscopía de lapso de tiempo (Etaluma 400 iVue, Lumascope™), tomando una imagen cada 5 min durante 60 h. Las imágenes fueron procesadas para obtener gráficos de confluencia a lo largo del tiempo en el área de la herida y los valores de velocidad de desplazamiento. Para el mapeo óptico utilizaron el colorante para calcio Rhod-2, una fuente de luz LED verde filtrada con longitud de onda máxima 524 nm (CBT-90-G, Luminus Devices Inc.), con un lente plano-convexo y un

filtro de excitación verde (D540/25X, Tecnología Chroma®). Utilizaron dos fuentes de luz de este tipo para lograr una iluminación homogénea. La fluorescencia fue registrada con una cámara EMCCD (Evolve-128, Somos®), con un filtro de emisión adecuado para emisiones de Rhod-2, ubicado frente a una lente de cámara de alta velocidad (Navitar DO-2595). Los resultados de este estudio confirmaron que el uso de membranas flexibles PDMS, induce un fenotipo cardiaco cercano al expresado *in vivo*, especialmente caracterizado por velocidades de conducción mayores. Adicionalmente, observaron una mayor expresión de genes involucrados en la generación y propagación del potencial de acción. Las membranas flexibles permitirán estudios detallados del efecto de la estimulación mecánica y eléctrica simultánea en el corazón.

Agladze y otros⁽¹³⁾ en 2017 investigaron la sincronización de la actividad eléctrica en cocultivos de células cardiacas de diferente origen, puestas en contacto directo. Específicamente trabajaron con cardiomiocitos de rata neonatal (NRVMC) y células HL-1. Para generar una línea HL-1 capaz de expresar ChR2 (canal iónico sensible a la luz, canalrodopsina-2), colocaron $1,2 \times 10^5$ células HL-1 en una placa de cultivo de 3 cm y se transdujeron un día después con el lentivirus que expresa ChR2 con una multiplicidad de infección de 50. Las células se cargaron con el colorante sensible al calcio Fluo-4. Las señales de calcio se monitorearon utilizando una configuración de imágenes de alta velocidad, mediante un microscopio fluorescente (Olympus MVX-10) equipado con una cámara EMCCD (Andor 897-U). Encontraron que los cultivos con células de diferente origen son capaces de sincronizarse, lo que sugiere la formación de acoplamiento eléctrico entre ellas. Estos resultados pueden considerarse como una prueba de concepto de que las células injertadas pueden acoplarse eléctricamente con el tejido cardiaco del huésped.

Houston y otros⁽¹⁴⁾ en 2018 estudiaron los núcleos de reentradas en monocapas celulares mediante el uso de mapeo óptico de fluorescencia con alta resolución temporal. El objetivo fue obtener información sobre los mecanismos reentrantes que mantienen las arritmias. Implementaron cultivos monocapa de la línea celular HL1-6, un subclon de las células originales HL-1,⁽¹⁷⁾ que es funcionalmente más homogénea que la línea original.⁽³⁰⁾ Implementaron mapeo óptico dual para capturar simultáneamente voltaje y transitorios de calcio. Los cultivos fueron cargados con el colorante Fluo-4 para visualizar los transitorios de calcio y, posteriormente, con el colorante Di-8-ANNEPS para visualizar los potenciales de membrana. Las células fueron sometidas a luz con 494 nm de longitud de onda y se capturó del espectro de emisión a 516 nm. Utilizaron un sistema hecho a medida (Cairn Research Ltd.), el cual se construyó alrededor de un microscopio vertical (Eclipse

FN1), la luz de excitación (470 nm) fue suministrada por un sistema OptoLED y la fluorescencia emitida se recolectó mediante una lente de inmersión en agua (Olympus). Usaron un divisor de haz dicróico de borde único (BrightLine) de 560 nm, ubicado en un divisor de imagen (Optosplit II, Cairn Research Ltd.). La luz fluorescente se dividió en dos haces que pasaron a través de filtros de emisión (525 nm y 628 nm). Los registros se capturaron a 100 fotogramas/s con una cámara sCMOS (Andor scientific-CMOS), correspondiente a la siguiente generación de CMOS, que ofrece ruido extremadamente bajo, amplio rango dinámico, alta eficiencia cuántica, mayor velocidad, alta resolución, y un gran campo de visión. Los resultados mostraron reentradas en los cultivos de cardiomiocitos HL1-6 (Fig. 3A). Para su establecimiento se requirieron al menos dos “disparadores” y un área mínima de cultivo (3,5-6,4 mm²). Después de que la actividad eléctrica terminara por completo y se reiniciara, variando la concentración de potasio extracelular, las reentradas nunca regresaron a la misma ubicación, mientras que el 35 % de los disparadores reaparecieron en la misma posición. Este trabajo evidenció que el núcleo de las reentradas son bloques de conducción constituidos por líneas y/o grupos de células en lugar de un área redonda. En las figuras 3B y 3C se observa cómo las células del núcleo pueden no expresar un transitorio de calcio (células 1, 2 y 3). Estos resultados sugieren que las células del núcleo están despolarizadas y, por lo tanto, bajo periodo refractario de manera análoga a la hipótesis del “círculo líder”, el cual establece que una reentrada continúa circulando alrededor de un área central que se mantiene refractaria. El hecho de que las reentradas nunca regresen a la misma ubicación, y que una vez formadas sean muy estables, puede explicar por qué la fibrilación auricular se estabiliza con el tiempo.

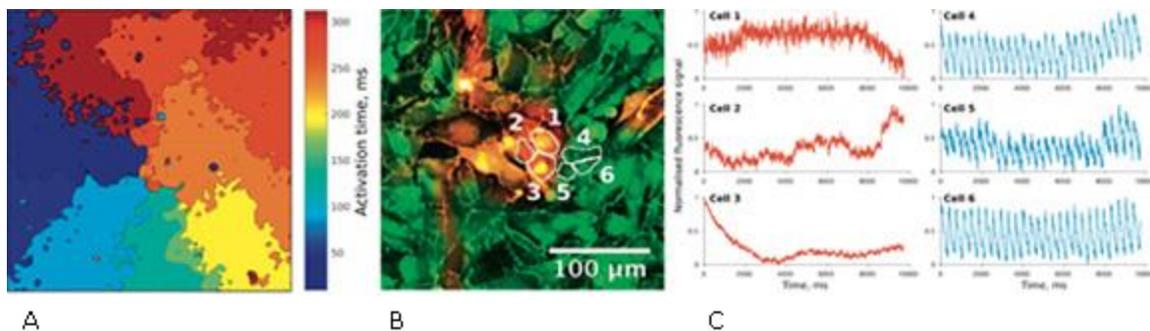


Fig. 3 – A. Mapa de activación de reentrada en cultivo HL1-6. **B.** Imagen ampliada del área de bloqueo.

C. Registro de transitorios de calcio para las células indicadas en la micrografía.

Fuente: Houston y otros,⁽¹⁴⁾ y publicado por *International Society for Heart Research* con licencia *Creative Commons*.

Discusión

Los diferentes estudios coinciden en seguir las especificaciones dadas por *Claycomb*, y otros⁽¹⁷⁾ para el cultivo y mantenimiento de células HL-1. Esto permite contar con cultivos monocapa de alta confluencia (aproximadamente a los 3 días) y capacidad eléctrica adecuada para llevar a cabo estudios de mapeo óptico sobre las propiedades electrofisiológicas,^(11,13) y condiciones arritmogénicas.^(5,10,12,14) Algunos trabajos incorporan sustratos que mejoran las propiedades eléctricas de dichos cultivos.^(26,27,28,29) En cuanto al mapeo óptico, los estudios difieren en la utilización de los colorantes fluorescentes. Algunos implementan colorantes sensibles al calcio como el Rhod-2 y Fluo-4, y otros utilizan colorantes sensibles al voltaje como RH237, Di-4-ANNEPS y Di-8-ANNEPS. Sin embargo, es más común utilizar colorantes de calcio, ya que el ciclo del calcio es posiblemente el componente más importante del acoplamiento cardiaco de excitación-contracción. Dos de los trabajos revisados implementaron mapeo dual (calcio y voltaje).^(11,14) El progreso de estos sistemas de mapeo óptico multiparamétrico permite una mejor comprensión de la fisiología celular a nivel de tejidos y órganos. Los sistemas reportados en los diferentes estudios difieren en cuanto a la implementación de cámaras CMOS y CCD. Conceptualmente son idénticas, ambas convierten la luz en electrones o cargas eléctricas, pero tienen arquitecturas distintas. El desarrollo de las CCD ha dado lugar a dispositivos de carga acoplada con multiplicación de electrones EMCCD, los cuales se han establecido actualmente como la tecnología líder en detección de imágenes para aplicaciones de microscopía biológica con poca luz.⁽¹⁾ No obstante, se ha sugerido que las cámaras sCMOS de última generación tienen el potencial de superar la competencia o, incluso, suplantarse a las cámaras EMCCD. Son muy pocos los trabajos que describen los protocolos de estimulación. Este tipo de información es relevante, teniendo en cuenta que los cultivos al estar en medio líquido deben estimularse con pulsos de alto voltaje (aproximadamente 40 V).

La revisión evidenció la importancia del mapeo óptico en el estudio de la generación y mantenimiento de mecanismos arritmogénicos como reentradas. Es posible analizar las condiciones de estabilidad⁽¹⁰⁾ y las dinámicas de sus núcleos de rotación⁽¹⁴⁾ mediante mapas de activación y el registro de señales de voltaje y/o transitorios de calcio. Adicionalmente, mediante esta técnica no solo es posible explorar la actividad eléctrica estable y caótica de cultivos cardiacos, sino también la obtención de electrogramas, lo que permite la caracterización y correlación de señales fragmentadas y no fragmentadas con la actividad reentrante.⁽¹⁰⁾ Es posible, además, estudiar

las alternancias del potencial de acción y alteraciones en las propiedades electrofisiológicas, ocasionadas por el estiramiento mecánico.^(11,31) Algunos trabajos han mostrado la utilidad de esta técnica en el estudio de los procesos de remodelación del tejido durante fibrilación auricular,^(5,12) en la detección de mecanismos arritmogénicos inducidos por fármacos,⁽³²⁾ o por un exceso de sodio intracelular.⁽³³⁾ Por otra parte, a través del procesamiento de los registros ópticos ha sido posible la generación de mapas de contorno y de fase, los cuales facilitan el estudio de la estabilidad de rotores.⁽¹²⁾ Otro campo que se ha visto beneficiado del mapeo óptico es la ingeniería de tejidos cardiacos,⁽³⁴⁾ en el que se han llevado a cabo estudios sobre la biocompatibilidad de nuevos materiales para la regeneración de miocardio;^(27,28) membranas diseñadas para parches cardiacos⁽²⁹⁾ y viabilidad de injertos cardiacos a través cocultivos celulares.⁽¹³⁾ Por lo expuesto, el mapeo óptico cardiaco se ha convertido en una tecnología potente y esencial en el estudio de la función cardiaca en condiciones fisiológicas y patológicas, y nuevos enfoques terapéuticos.

Existen, sin embargo, algunas limitaciones. El mapeo óptico en cultivos monocapa de células HL-1 representa un modelo simplificado de las características tridimensionales que existen en el tejido vivo. Los cultivos de células HL-1 y el tejido auricular humano presentan diferencias electrofisiológicas evidentes en los resultados; a decir, proliferación continua, menor velocidad de conducción y frecuencia de activación durante la fibrilación. Es posible que la actividad reentrante observada en estos modelos simplificados se genere por mecanismos diferentes a los del tejido cardiaco, donde efectos como la heterogeneidad estructural (orientación de fibras, anisotropía, tejido fibrótico, entre otras) desempeñan un papel clave en la progresión de las arritmias. Los modelos monocapa no reflejan de manera precisa la conducción a través de estructuras complejas, como los músculos pectíneos, y no reproducen el bloqueo de conducción causado por problemas estructurales. Por esta razón, la extrapolación de los resultados a las arritmias humanas debe realizarse con cuidado.

Actualmente, y con el fin de superar las limitaciones de los estudios *in vitro* en cultivos monocapa, se llevan a cabo estudios de mapeo óptico en corazones *ex vivo*, mediante sistemas de perfusión *Langendorff*. Esto ha permitido ampliar el conocimiento sobre las arritmias cardiacas y el papel de las estructuras complejas del corazón.^(35,36,37) La aplicación del mapeo óptico continúa expandiéndose, incluso penetrando en los campos de la bioingeniería y la optogenética. El desarrollo de nuevos colorantes sensibles al espectro infrarrojo, permitirá el estudio *in vivo* de la

propagación de potencial de acción, utilizando sofisticados protocolos de mapeo basados en catéter.⁽¹⁾

Conclusiones

En el presente trabajo se realizó una revisión sobre los estudios electrofisiológicos que involucran la línea celular HL-1 utilizando la técnica de mapeo óptico. Los trabajos difieren respecto a la tecnología de los equipos de mapeo y sus cámaras, a la utilización de diferentes colorantes fluorescentes y respecto al objetivo del estudio. Diversos trabajos están enfocados en el estudio de mecanismos arritmogénicos, el análisis de las señales ópticas, el estudio de procesos de estiramiento mecánico o remodelación del tejido durante fibrilación auricular, y el análisis de nuevos biomateriales para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Lo anterior sustenta la relevancia del mapeo óptico en la investigación cardiaca. Los avances en el campo permitirán que esta tecnología se convierta en una herramienta fundamental para la investigación en cardiología y terapias regenerativas.

Referencias bibliográficas

1. Herron TJ, Lee P, Jalife J. Optical Imaging of Voltage and Calcium in Cardiac Cells Camp; Tissues. *Circ Res.* 2012;110(4):609-23. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.111.247494](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247494)
2. Takahashi Y, Iwai S, Yamashita S, Masumura M, Suzuki M, Yabe K, *et al.* Novel Mapping Technique for Localization of Focal and Reentrant Activation During Atrial Fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2017;28(4):375-82.
3. Omichi C, Lamp ST, Lin S-F, Yang J, Baher A, Zhou S, *et al.* Intracellular Ca dynamics in ventricular fibrillation. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2004;286(5):H1836-44. DOI: [10.1152/ajpheart.00123.2003](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00123.2003)
4. Hernández-Romero I, Guillem MS, Figuera C, Atienza F, Fernández-Avilés F, Climent M. Optical imaging of voltage and calcium in isolated hearts: Linking spatiotemporal heterogeneities and ventricular fibrillation initiation. Tolkacheva EG, editor. *PLoS One.* 2019;14(5):e0215951. DOI: [10.1371/journal.pone.0215951](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215951)

5. Climent M, Guillem MS, Lee P, Bollensdorff C, Atienza F, Fernández-Santos ME, *et al.* An In-Vitro Model of Cardiac Fibrillation with Different Degrees of Complexity. In: XIII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing 2013. 2014. [acceso: 20/03/2020]. p. 340-3. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-00846-2_84
6. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 7th ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2015.
7. Sommariva E, Stadiotti I, Perrucci GL, Tondo C, Pompilio G. Cell models of arrhythmogenic cardiomyopathy: advances and opportunities. *Dis Model Mech.* 2017;10(7):823-35. DOI: [10.1242/dmm.029363](https://doi.org/10.1242/dmm.029363)
8. Jaimes R, Walton RD, Pasdois P, Bernus O, Efimov IR, Kay MW. A technical review of optical mapping of intracellular calcium within myocardial tissue. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2016;310(11):H1388-401. DOI: [10.1152/ajpheart.00665.2015](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00665.2015)
9. Peter AK, Bjerke MA, Leinwand LA. Biology of the cardiac myocyte in heart disease. Drubin DG, editor. *Mol Biol Cell.* 2016;27(14):2149-60. DOI: [10.1091/mbc.E16-01-0038](https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0038)
10. Umopathy K, Masse S, Kolodziejska K, Veenhuyzen GD, Chauhan VS, Husain M, *et al.* Electrogram fractionation in murine HL-1 atrial monolayer model. *Hear Rhythm.* 2008; 5(7):1029-35. DOI: [10.1016/j.hrthm.2008.03.022](https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2008.03.022)
11. Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, Yu CC, Wang YC, Lai LP, *et al.* Mechanical Stretch of Atrial Myocyte Monolayer Decreases Sarcoplasmic Reticulum Calcium Adenosine Triphosphatase Expression and Increases Susceptibility to Repolarization Alternans. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 58(20):2106-15. DOI: [10.1016/j.jacc.2011.07.039](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.07.039)
12. Climent AM, Guillem MS, Fuentes L, Lee P, Bollensdorff C, Fernández-Santos ME, *et al.* Role of atrial tissue remodeling on rotor dynamics: an in vitro study. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2015;309(11):H1964-73. DOI: [10.1152/ajpheart.00055.2015](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00055.2015)
13. Agladze NN, Halaidych OV, Tsvelaya VA, Bruegmann T, Kilgus C, Sasse P, *et al.* Synchronization of excitable cardiac cultures of different origin. *Biomater Sci.* 2017; 5(9):1777-85. DOI: [10.1039/C7BM00171A](https://doi.org/10.1039/C7BM00171A)
14. Houston C, Tzortzis KN, Roney C, Saglietto A, Pitcher DS, Cantwell CD, *et al.* Characterisation of re-entrant circuit (or rotational activity) in vitro using the HL1-6 myocyte cell line. *J Mol Cell Cardiol.* 2018; 119:155-64. DOI: [10.1016/j.yjmcc.2018.05.002](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.05.002)

15. Yan J, Thomson JK, Zhao W, Fast VG, Ye T, Ai X. Voltage and Calcium Dual Channel Optical Mapping of Cultured HL-1 Atrial Myocyte Monolayer. *J Vis Exp.* 2015; 97(97):52542. DOI: [10.3791/52542](https://doi.org/10.3791/52542)
16. White SM, Constantin PE, Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2004;286(3):H823-9. DOI: [10.1152/ajpheart.00986.2003](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00986.2003)
17. Claycomb WC, Lanson Jr NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, *et al.* HL-1 cells : A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95(6):2979-84.
18. Wang S, Sang J, Ding W, Qin T, Bai L, Zhang J, *et al.* The cytoprotection of small intestinal submucosa-derived gel in HL-1 cells during hypoxia/reoxygenation-induced injury. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(8):1346-61. DOI: [abs/10.1002/term.2878](https://doi.org/abs/10.1002/term.2878)
19. Clayton RH, Nash MP. Analysis of Cardiac Fibrillation Using Phase Mapping. *Card Electrophysiol Clin.* 2015; 7(1):49-58. DOI: [10.1016/j.ccep.2014.11.011](https://doi.org/10.1016/j.ccep.2014.11.011)
20. Miller JM, Kalra V, Das MK, Jain R, Garlie JB, Brewster JA, *et al.* Clinical Benefit of Ablating Localized Sources for Human Atrial Fibrillation: The Indiana University FIRM Registry. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(10):1247-56.
21. Prakosa A, Arevalo HJ, Deng D, Boyle PM, Nikolov PP, Ashikaga H, *et al.* Personalized virtual-heart technology for guiding the ablation of infarct-related ventricular tachycardia. *Nat Biomed Eng.* 2018;2(10):732-40.
22. Zaman JAB, Narayan SM. Ablating Atrial Fibrillation: Customizing Lesion Sets Guided by Rotor Mapping. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2015;11(2):76-81. DOI: [10.14797/mdcj-11-2-76](https://doi.org/10.14797/mdcj-11-2-76)
23. Climent AM, Hernandez-Romero I, Guillem Sanchez M de la S, Montserrat N, Fernandez ME, Atienza F, *et al.* High Resolution Microscopic Optical Mapping of Anatomical and Functional Reentries in Human Cardiac Cell Cultures. *Computing in Cardiology.* 2016;43:233-6. DOI: [10.22489/CinC.2016.070-474](https://doi.org/10.22489/CinC.2016.070-474)
24. Yang Z, Shen W, Rottman J, Wikswo J, Murray K. Rapid stimulation causes electrical remodeling in cultured atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38(2):299-308. DOI: [10.1016/j.yjmcc.2004.11.015](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.11.015)

25. Laughner JI, Ng FS, Sulkin MS, Arthur RM, Efimov IR. Processing and analysis of cardiac optical mapping data obtained with potentiometric dyes. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2012;303(7):H753-65. DOI: [10.1152/ajpheart.00404.2012](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00404.2012)
26. Gómez-Cid L. Characterization of the effect of the substrate over functional and electrophysiological properties during culture of cardiomyocytes. Madrid: Universidad Carlos III de Madrid; 2015.
27. Suggs LJ, Ramamoorthy D, Allen ACB, Geuss LR. Maintenance of HL-1 cardiomyocyte functional activity in PEGylated fibrin gels. *Biotechnol Bioeng.* 2015;112(7):1446-56. DOI: [10.1002/bit.25553](https://doi.org/10.1002/bit.25553)
28. Baheiraei N, Gharibi R, Yeganeh H, Miragoli M, Salvarani N, Di Pasquale E, *et al.* Electroactive polyurethane/siloxane derived from castor oil as a versatile cardiac patch, part II: HL-1 cytocompatibility and electrical characterizations. *J Biomed Mater Res Part A.* 2016;104(6):1398-407. DOI: [10.1002/jbm.a.35669](https://doi.org/10.1002/jbm.a.35669)
29. Gómez-Cid L, Fuentes L, Hernández-Romero I, Guillem MS, Atienza F, Fernández-Avilés F, *et al.* Role of Substrate Flexibility on Cardiac Cell Culture Electrophysiological Properties. In: *Computing in Cardiology.* 2016;43:749-52. DOI: [10.22489/CinC.2016.217-477](https://doi.org/10.22489/CinC.2016.217-477)
30. Dias P, Desplantez T, El-Harasis MA, Chowdhury RA, Ullrich ND, Cabestrero de Diego A, *et al.* Characterisation of Connexin Expression and Electrophysiological Properties in Stable Clones of the HL-1 Myocyte Cell Line. Barnes S, editor. *PLoS One.* 2014;9(2):e90266. DOI: [10.1371/journal.pone.0090266](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090266)
31. Del-Canto I, Gomez-Cid L, Hernandez-Romero I, Guillem MS, Fernández-Santos ME, Such L, *et al.* Ranolazine Attenuates Stretch-induced Modifications of Electrophysiological Characteristics in HL-1 Cells. In: *Computing in Cardiology.* 2017;44:1-4. DOI: [10.22489/CinC.2017.311-412](https://doi.org/10.22489/CinC.2017.311-412)
32. da Rocha AM, Creech J, Thonn E, Mironov S, Herron TJ. Detection of Drug-Induced Torsades de Pointes Arrhythmia Mechanisms Using hiPSC-CM Syncytial Monolayers in a High-Throughput Screening Voltage Sensitive Dye Assay. *Toxicol Sci.* 2020; 173(2):402-15. DOI: [10.1093/toxsci/kfz235](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz235)
33. Willis BC, Pandit SV, Ponce-Balbuena D, Zarzoso M, Guerrero-Serna G, Limbu B, *et al.* Constitutive Intracellular Na⁺ Excess in Purkinje Cells Promotes Arrhythmogenesis at Lower Levels of Stress Than Ventricular Myocytes From Mice With Catecholaminergic Polymorphic

Ventricular Tachycardia. Circulation. 2016;133(24):2348-59. DOI: [10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021936](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021936)

34. Wong T, Wong N, Geng L, Chow MZ, Lee EK, Wu H, *et al.* Combinatorial Treatment of Human Cardiac Engineered Tissues With Biomimetic Cues Induces Functional Maturation as Revealed by Optical Mapping of Action Potentials and Calcium Transients. *Front Physiol.* 2020; 11:165. DOI: [10.3389/fphys.2020.00165](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00165)

35. Uzelac I, Ji YC, Hornung D, Schröder-Scheteling J, Luther S, Gray RA, *et al.* Simultaneous Quantification of Spatially Discordant Alternans in Voltage and Intracellular Calcium in Langendorff-Perfused Rabbit Hearts and Inconsistencies with Models of Cardiac Action Potentials and Ca Transients. *Front Physiol.* 2017;8:819. DOI: [10.3389/fphys.2017.00819](https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00819)

36. Pezhouman A, Cao H, Fishbein M, Belardinelli L, Weiss J, Karagueuzian H. Atrial Fibrillation Initiated by Early Afterdepolarization-Mediated Triggered Activity during Acute Oxidative Stress: Efficacy of Late Sodium Current Blockade. *J Hear Heal.* 2018; 4(1):1-17. DOI: [10.16966/2379-769X.146](https://doi.org/10.16966/2379-769X.146)

37. Hansen BJ, Zhao J, Csepe TA, Moore BT, Li N, Jayne LA, *et al.* Atrial fibrillation driven by micro-anatomic intramural re-entry revealed by simultaneous sub-epicardial and sub-endocardial optical mapping in explanted human hearts. *Eur Heart J.* 2015;36(35):2390-401. DOI: [10.1093/eurheartj/ehv233](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv233)

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Catalina Tobón: contribuyó a la búsqueda bibliográfica, participó en la revisión y análisis de la información, en la redacción y aprobación del manuscrito.

Juan Pablo Ugarte: contribuyó a la búsqueda bibliográfica, participó en la revisión y análisis de la información, en la redacción y aprobación del manuscrito.

Laura Carolina Palacio: realizó la búsqueda bibliográfica y participó en la redacción del manuscrito.

Financiación

El trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación - MINCIENCIAS, Colombia, a través del proyecto n.º 120677757994.