

INVESTIGACIÓN BÁSICA

Actividad rítmica del músculo papilar inducida por estimulación de alta frecuencia: ritmos n:1, formas de transición e histéresis

Hortensia González,* Araceli Torres,* Claudia Lerma,** Gabriela Arriola,* Gustavo Pastelín,** Humberto Arce*

Resumen

Los tejidos cardíacos son capaces de trabajar en un amplio intervalo de frecuencias con el fin de atender las distintas demandas que el organismo impone al sistema cardiovascular. Sin embargo, bajo un régimen de cambios de frecuencia y con ciertas condiciones patológicas, pueden desarrollarse arritmias, como bloqueos, taquicardias, fibrilaciones, etc. de posibles consecuencias fatales. Esto motiva la realización de diversos arreglos experimentales en los cuales se explora el comportamiento del corazón, o de regiones de éste. En este artículo reportamos diversos fenómenos que ocurren en el músculo papilar de cobayo cuando se le estimula eléctricamente, desde una frecuencia basal de un pulso por segundo (pps) hasta frecuencias muy altas, de varias decenas de pps, pero incrementando paulatinamente la frecuencia de estimulación. Describimos que en nuestras condiciones experimentales, el músculo despliega sucesivamente ritmos tipo n:1 (una respuesta cada n estímulos) con n creciente; encontramos también que entre uno y otro de estos ritmos aparecen diversas formas de transición, entre las cuales describimos una totalmente nueva en este sistema, que hemos denominado por "ráfagas"; finalmente mostramos que este sistema exhibe de manera generalizada histéresis en la frecuencia, siendo el primer reporte que se hace para

Summary

ARRHYTHMIC ACTIVITY OF THE PAPILLARY MUSCLE
INDUCED BY HIGH FREQUENCY STIMULATION:
RHYTHM N:1, TRANSITION FORMS AND HYSTERESIS

Cardiac tissues are able to work within a wide range of frequencies to respond to the changing requirements an organism may have. However, during these frequency variations and under certain pathologic conditions arrhythmias such as blocks, tachycardia, fibrillation, etc, may arise some with fatal consequences. For this reason several experimental procedures have been developed that have shown to be useful in studying whole heart properties, or as an alternative from portions of it when changes in its work rate are imposed. This study reports different phenomena occurring in the papillary muscle of the guinea pig heart when stimulated at very high frequency, of several tens of pps, while analyzing its responses during gradual increments starting at 1 (pulses per second). We found that in our conditions papillary muscles display N:1 rhythms with progressive higher N; further more we found that between one and the next rhythm diverse transition patterns appear, among them a new one that we have named "burst pattern". Finally we show that our system exhibits a generalized process of hysteresis by frequency, being this the first report for guinea pig cardiac tis-

* Facultad de Ciencias UNAM.

** Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Correspondencia: Hortensia González. Laboratorio de Biofísica. Departamento de Física. Facultad de Ciencias. UNAM. AP 70-542. Teléfono 5622-4855, Fax: 5622-4854, hgg@hp.fciencias.unam.mx

Recibido: 23 de enero 2003

Aceptado: 12 de agosto 2003

esta especie y además el primer reporte en el que se muestran varias "asas" o regiones de histéresis por frecuencia dentro de una misma excursión experimental. Debido al gran volumen de datos generados, hemos introducido una forma de presentación y análisis concisa y eficiente, basada en los espectros de potencia de los datos obtenidos a través de la transformada rápida de Fourier. Este método también se describe brevemente en el artículo.

sue and the first one to show also the presence of several hysteresis loops in the same experiment. Due to the large volume of generated data we used a faster and easier way to analyze and display them, based on the fast Fourier transform (FFT). The method is briefly described.
(Arch Cardiol Mex 2004; 74:11-24).

Palabras clave: Electrofisiología del músculo papilar. Ritmos cardíacos. Histéresis por frecuencia.
Key words: Papillary muscle electrophysiology. Cardiac rhythms. Frequency hysteresis

Introducción

Los ritmos fisiológicos no son estrictamente periódicos, sus fluctuaciones surgen de la combinación de influencias del medio ambiente y de variables internas del organismo. Siendo el ritmo cardíaco prototipo de esa capacidad adaptativa, el estudio de las diversas influencias que lo alteran ha sido desde siempre de interés para la fisiología, en especial en situaciones de enfermedad, cuando esta capacidad del corazón para ajustarse a demandas cambiantes se ve disminuida o francamente alterada.¹ En investigación básica del sistema cardiovascular, ha sido útil el desarrollo de modelos experimentales o computacionales para entender los efectos de someter al corazón, o algunas porciones de éste, a distintos patrones de estimulación, encontrándose que los efectos pueden ser muy complejos. Así, durante protocolos de estimulación periódica se pueden observar diversos ritmos acoplados a la estimulación y también ritmos asincrónicos.²⁻⁵ Por ejemplo, existen diversas condiciones patológicas o experimentales, en que regiones del corazón pasan de exhibir un ritmo de actividad 1:1 (estímulos: respuestas) a un ritmo con bloqueo 2:1,⁶ esto es, de cada dos estímulos recibidos se produce sólo una respuesta. Este tipo de actividad puede observarse cuando se aumenta la frecuencia de estimulación (f.e.), cuando se reduce la intensidad de estimulación, o bien cuando existe alguna condición de excitabilidad disminuida, como por ejemplo por un descenso en la temperatura o alto potasio extracelular. Si se continúa reduciendo el intervalo entre estímulos, o se deterioran más las condiciones del tejido, pueden verse otros ritmos o bloqueos.^{3,7-8} Con la ayuda de modelos teóricos se

pueden organizar los diferentes patrones de respuesta en función de alguna de las variables estudiadas: intensidad del estímulo, f.e. o de algún parámetro asociado a la excitabilidad del tejido, como la concentración de potasio extracelular.^{3,4} En ciertos casos estas descripciones siguen secuencias descritas por modelos matemáticos deterministas, como en las secuencias de bifurcación que predicen las transiciones de ritmos: 1:1 -> 2:2 -> 4:4 -> ...-> Caos.^{9,10} Sin embargo, en la generalidad de los casos experimentales es difícil lograr todos los patrones de acoplamiento entre los estímulos y respuestas que propone la teoría, entre otras cosas debido a que en los organismos el propio patrón de actividad modifica las propiedades del sistema a lo largo del tiempo, lo cual es poco considerado en los modelos teóricos.

En este trabajo revisamos los patrones de actividad del músculo papilar de cobayo cuando lo sometemos a estimulación de frecuencia creciente, alcanzando varias decenas de pulsos por segundo. Observamos que la actividad pasa por ritmos en los que el número de respuestas que se bloquean aumenta con la frecuencia. Además, estos ritmos que se denominan n:1,² son estables en intervalos de frecuencias cada vez menores, es decir, conforme aumenta la f.e. el tejido puede de sostener cada vez durante menos tiempo un ritmo determinado. Encontramos también que el tejido bajo estas condiciones exhibe histéresis, la sucesión de ritmos que se despliega en las distintas frecuencias dependen del sentido de la variación de la frecuencia. Dada la importancia clínica del patrón de actividad llamado 2:1, hemos prestado especial interés a las formas de transición del ritmo 1:1 al ritmo 2:1. Encontramos que

a las formas de transición ya descritas en la literatura: directa, por alternancias y tipo Wenckebach (refs. 1-4 en 11), se agrega una que hemos denominado por “ráfagas”, y consiste en que para una misma f.e. el sistema fluctúa espontáneamente entre los ritmos 1:1 y 2:1 repetidas veces. Hasta donde conocemos, no se había obtenido ni estudiado este tipo de actividad de manera sistemática, si bien existe una referencia a actividad semejante observada en fibras de Purkinje de perro reportada por Chialvo y Jalife.¹²

Método.

Preparación biológica

Se emplearon cobayos machos de 600 a 800 g de peso, que fueron anestesiados con Pentobarbital por v.i.p. a una dosis de 0.1 mL por cada 100 g de peso del animal. Se disecó uno de los músculos papilares izquierdos, que fue rápidamente trasladado a una cámara de perfusión conteniendo solución salina de Krebs a 36° C, pH 7.4 y burbujeo de gas carbógeno. La composición de la solución salina fue, expresada como mM: NaCl 117.8, NaH₂PO₄ 1.2, EDTA 0.027, KCl 4.6, CaCl₂ 1.6, NaHCO₃ 25, Dextrosa 5.5 y MgSO₄ 1.2. La adición de EDTA asegura la captura del calcio excedente en el agua.

La estimulación al tejido se realizó en la región apical de músculo mediante electrodos bipolares finos impolarizables de plata/cloruro de plata, que en el rango de frecuencias utilizado (1-50 pps) y para la intensidad de corriente empleada, no modifican sus propiedades.¹³ Se aplicaron pulsos de intensidad dos veces umbral y 2 ms de duración, generados por un estimulador en modo de corriente constante (1-5 mA, Frederick Haer 6bp) cuyo funcionamiento fue verificado mediante calibración con resistencias de precisión. Este modelo tiene integrada una unidad para el aislamiento óptico de los pulsos de la referencia a tierra física. Los electrodos de estimulación se colocaron en el ápice del músculo con una separación entre ellos de 1 mm. En todos los casos las frecuencias basales de estimulación fueron 1 pps. En un grupo de (n= 14) experimentos la frecuencia se incrementó hasta alcanzar la máxima frecuencia para la cual el sistema pudo generar respuestas con un patrón regular perceptible durante el tiempo de registro. En otro grupo (n= 18), una vez alcanzada esta frecuencia máxima, se disminuyó con intervalos semejantes a los que se utilizaron durante la fase de incremento.

El registro de los potenciales de acción (PA) se hizo intracelularmente empleando pipetas de vidrio que contenían KCl 2 M y de resistencias entre 40 y 80 MΩ. Los electrodos, colocados en la región basal de músculo, a una distancia promedio de 3.1 ± 0.13 mm respecto del punto de estimulación, se conectaron a un electrómetro WPI-Electro 705 con impedancia de entrada de 10^{12} y modo de rechazo $> 10^4:1$. Los registros se desplegaron en un osciloscopio digital (OD) TEKTRONIX-TDS 3012 y simultáneamente se grabaron en videocasetes a través de una digitalizadora Instrutrech VR10B con frecuencia de muestreo de 94.4 Km/s y una resolución de 14 bits. Cada corrida experimental se inició dejando estabilizar la actividad del músculo papilar a 1 pps durante 15 minutos. A partir de ese momento se hicieron incrementos en la frecuencia, dejando al músculo trabajar durante 30 segundos en cada f.e., antes de dar el siguiente incremento.

Análisis de los datos

Las series de datos grabadas se analizaron nuevamente en el OD, se seleccionaron 20 segundos de los 30 que correspondían a cada f.e. estudiada. Con estos datos se generaron archivos para PC mediante el programa WAVESTART™ a una velocidad de muestreo de 500 mps de manera que la serie completa de datos constó de 10,000 puntos. Los archivos generados fueron almacenados con formato ASCII. Debido a que el volumen de datos generados fue muy grande, se diseñó una rutina de procesamiento para facilitar su análisis. Se obtuvo el espectro de potencia de las series o subseries de datos mediante la Transformada Rápida de Fourier (por sus siglas en inglés FFT) con una aplicación de MathLab (V5.3.1, The MathWorks Inc 99), para ello: a) Pasamos una ventana de promediación por la serie de datos, que incluía dos puntos antes y dos puntos después de cada punto, esto para eliminar el ruido de alta frecuencia; b) Se eliminó cualquier tendencia lineal que pudiese tener el nivel basal de la serie de datos, para lo cual se ajustó una recta a la serie de datos por el método de mínimos cuadrados (m.c.), restando después punto a punto los datos de la serie con sus equivalentes de la recta ajustada; c) Se trasladó la serie de datos para que el promedio del potencial de reposo coincidiera con el cero; d) Se eliminaron o redujeron los artefactos debidos a los pulsos del estimulador, usando un método de de-

tección de umbral; y e) Se obtuvo el espectro de potencias a partir de la FFT. f) Se detectó cuál era el armónico principal y su frecuencia asociada. El conjunto de frecuencias de los armónicos principales de cada serie experimental se graficó contra las frecuencias de estimulación correspondientes, y se ajustaron líneas rectas a los conjuntos de puntos agrupados en torno a una misma pendiente. Se obtuvieron los valores de la pendiente mediante m.c. y del coeficiente de determinación (r^2) para cada segmento de recta ajustado.

Resultados

Como respuesta a las frecuencias iniciales de estimulación el resultado típico encontrado es el que desplegamos en la parte superior de la *figura 1*. En el panel A de esta figura se muestra el espectro de potencias de un tren de PA producidos cuando se estimula a 6 pps. El armónico principal es el primero y además su frecuencia coincide con la f.e. Los picos restantes tienen frecuencias que corresponden a múltiplos de la frecuencia del armónico principal y tienen amplitudes cada vez menores. Estos picos de amplitud menor son subarmónicos y se deben al tipo de operador matemático que se usó para calcular el espectro de potencia, la FFT, y a la forma característica de las señales a la que se aplica, un PA con un perfil casi rectangular. En el panel B de esa misma figura, desplegamos parte del tren de potenciales de acción que dieron lugar a este espectro. En ese panel hemos marcado con líneas gruesas verticales la posición temporal de los estímulos, dejando en la señal original un remanente de los artefactos de estimulación para mostrar su coincidencia con los marcadores antes descritos. A esta frecuencia cada estímulo dispara un PA, cuyas características (duración, amplitud, Vmax, etc) se repiten una y otra vez. Este patrón de actividad se denomina 1:1, puesto que con cada estímulo se dispara un PA y todos los potenciales del tren tienen las mismas características. Este ritmo ocurre en un ancho intervalo de frecuencias, de los 32 experimentos realizados se encontró desde 1 pps hasta 10.19 ± 2.79 pps (media \pm d.e.).

El siguiente ritmo encontrado en un amplio intervalo de frecuencias es el 2:1 (desde 10.19 ± 2.79 pps hasta 19 ± 7.66). En la corrida experimental que hemos seleccionado para ilustrar la mayoría de las figuras de este manuscrito, el ritmo 2:1 hizo su aparición a una f.e. de 7 pps, es

dicho, la siguiente f.e. que se exploró después de la usada para producir los paneles A y B de la *figura 1*. Puede verse en el panel C de la misma *figura 1* que el espectro de potencias para 7 pps es muy parecido al de 6 pps, sin embargo su armónico principal, que es también el primero, cae a la mitad de la f.e. correspondiente. La explicación de este hecho puede verse en el panel D, en el cual hemos efectuado un pequeño corrimiento temporal de los datos, para hacer coincidir la posición de cada uno de los estímulos iniciales mostrados en los paneles B y D. Comparando ambas gráficas puede notarse que el intervalo de tiempo entre estímulos es semejante, de hecho hay una diferencia de 23.75 milisegundos entre el primero y el segundo, no obstante, basta esta pequeña diferencia para impedir en el segundo caso la adecuada recuperación fisiológica del papilar y provocar la desaparición de uno de cada dos pulsos. Entonces, el complejo que se repite lo hace cada 280 milisegundos, lo cual nos reduce la frecuencia del primer armónico a la mitad de la f.e. En el espectro se observan subarmónicos con frecuencias múltiplos de la principal. Nótese que este efecto aumenta el tiempo de recuperación del PA que consigue dispararse, de manera que los PA a 7 pps son de mayor duración y amplitud que los PA a 6 pps.

Obtuvimos el espectro de potencias para todas las frecuencias de estimulación de las distintas corridas experimentales. En la mayoría de los casos el espectro tiene la apariencia que hemos mostrado en los páneles a la izquierda de la *figura 1*. En la *figura 2* hemos concentrado los resultados de una corrida experimental, graficando la frecuencia del primer armónico de cada espectro de potencias contra la f.e. a la cual fue producida la serie de datos correspondiente. Los círculos de la *figura 2* se organizan casi todos en líneas rectas, cuyas pendientes toman los siguientes valores: ritmo 1:1 $m = 0.996$ con $r^2 = 0.998$; ritmo 2:1 $m = 0.57$ con $r^2 = 0.995$; ritmo 3:1 $m = 0.36$ con $r^2 = 0.981$; con el ritmo 4:1 tenemos sólo dos puntos entre los cuales se puede calcular la pendiente 0.25. La primera pendiente refleja el hecho de que la mayoría de sus puntos coinciden la frecuencia armónica principal y la f.e., esto es, son trenes de PA con ritmo 1:1. La pendiente de la segunda recta consiste de los puntos que tienen la frecuencia de su armónico principal a la mitad de la f.e., es decir, corresponden a comportamientos tipo 2:1. En la tercera y cuarta región de puntos la mayoría corres-

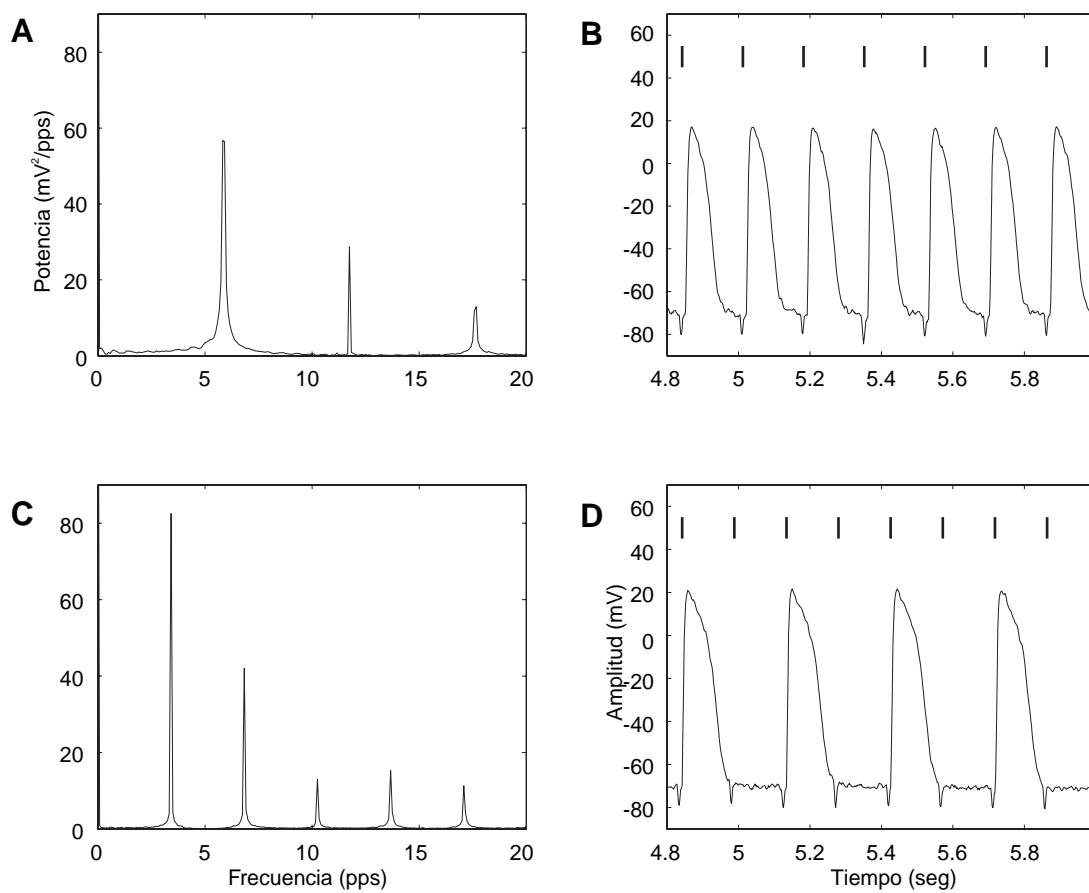


Fig. 1. Ritmos 1:1 y 2:1. En los páneles A y C se muestran los espectros de potencia obtenidos mediante la FFT aplicada a trenes de PA del músculo papilar de cobayo; la f.e. fue de 6 y 7 pps respectivamente. Las series de PA se muestran en los páneles B y D. En éstos las líneas verticales representan la posición de los estímulos. Nótese que en el panel A, la frecuencia del armónico principal coincide con la f.e., mientras que en el panel C la frecuencia del armónico principal es exactamente la mitad de la f.e. correspondiente, esto a pesar de que ambas frecuencias de estimulación son muy parecidas.

ponden a trenes de potenciales de acción con ritmos 3:1 y 4:1, de manera que la frecuencia del armónico principal cae en un tercio y un cuarto de las frecuencias de estimulación respectivas. Finalmente tenemos un punto en el extremo derecho de esta serie de datos donde los potenciales de acción se comportaron con un ritmo 5:1. En la figura 3 mostramos algunos patrones de potenciales a ritmos 3:1, 4:1 y 5:1, que se han tomado de los datos experimentales usados para construir la figura 2.

En los párrafos anteriores hemos matizado, diciendo que el comportamiento descrito corresponde a la mayoría de los datos experimentales y no a todos. Hemos tenido que introducir este viso porque los datos muestran pequeñas desviaciones del comportamiento general, por ejemplo, en el tren de PA tomado para calcular el espectro de poten-

cias desplegado en el panel A de la figura 1, pueden ocurrir que algunos PA aparezcan con ritmo 2:1 o 2:2. La ocurrencia de estos ritmos alternantes aumenta el error de ajuste en los extremos de las rectas que agrupan nuestros datos, y de alguna manera prefiguran que ocurrirá un cambio en el ritmo. Algunas veces encontramos en estas regiones de la f.e. patrones de comportamiento que no se ajustan a la descripción tipo n:1, que son relativamente estables y son llamados *patrones de transición*. Hemos estudiado con más cuidado los patrones que aparecen entre los ritmos 1:1 y 2:1 por ser estos ritmos de mayor importancia clínica, aunque las características descritas para estos patrones ocurren en general para las transiciones entre los otros ritmos.

Encontramos además de la transición directa, ilustrada en la figura 1, tres tipos de transiciones

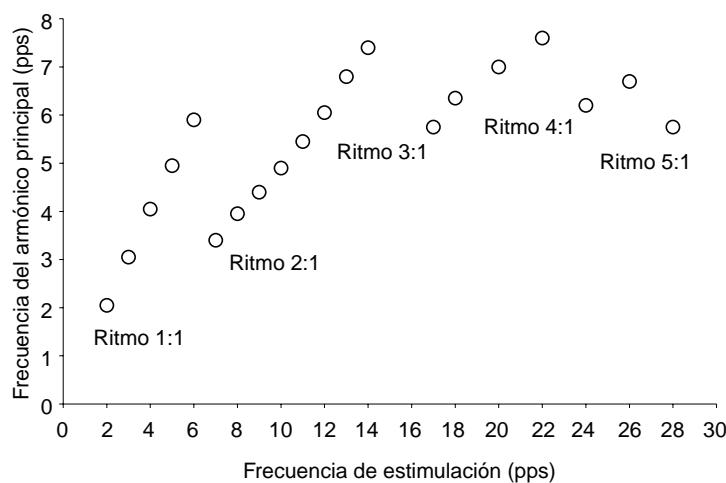


Fig. 2. Armónicos principales de una corrida experimental. Cada punto fue calculado de los períodos de 20 segundos de estimulación a frecuencia constante. Los incrementos en la f.e. se presentan en las abscisas de la gráfica, las ordenadas corresponden a la frecuencia del armónico principal en el espectro de potencia correspondiente. La organización de los puntos en torno a líneas rectas refleja que los ritmos dominantes son del tipo $n:1$, es decir, cada n estímulos se dispara un PA. Las desviaciones del comportamiento lineal se dan cerca de los extremos de las líneas rectas debido a que el sistema se inestabiliza cuando se encuentra cerca de los cambios de ritmo. Los últimos ritmos se mantienen por intervalos de frecuencias cada vez menores.

indirectas que ilustramos en la *figura 4*. Una de ellas, la transición vía alternancias o ritmo 2:2 ha sido ampliamente descrita en la literatura;¹⁴⁻¹⁷ otra transición llamada tipo Wenckebach, ha sido descrita desde hace mucho tiempo para el nodo aurículo-ventricular¹⁸ y para otro tipo de estructuras cardíacas.^{19,20} Sin embargo un tercer tipo de transición que hemos denominado por ráfagas, no ha sido reportada de manera sistemática hasta donde tenemos noticia. Debemos recordar que para estudiar los datos correspondientes a las transiciones hemos trabajado con subseries de los 20 segundos capturados, pues en el curso de un mismo periodo de estimulación pueden presentarse varios comportamientos, tal como han reportado otros autores.⁷

En la *figura 4* pueden verse del lado izquierdo los patrones de actividad de cada una de las transiciones encontradas. En los paneles de la derecha se muestran los espectros de potencia de cada patrón de actividad. En el panel A mostramos un patrón de alternancias, que ocurrió a 12.8 pps. En este tipo de ritmo se repite el patrón de actividad cada dos estímulos. El patrón de actividad consta de dos PA bien desarrollados, pero distintos entre sí, generalmente la diferencia se nota en la amplitud o duración. El espectro de potencias de este ritmo es característico (panel B), pues

la frecuencia del armónico principal coincide con la de estimulación, pero existe un pequeño pico a la mitad de la f.e.. Este pico se debe a que la alternancia de amplitudes en los PA se traduce en una oscilación de frecuencia baja que se repite cada dos PA. Cuanto mayor sea la diferencia de amplitud entre potenciales sucesivos, mayor será el tamaño de su subarmónico asociado.

En el panel C de la *figura 4*, hemos desplegado una de las transiciones tipo Wenckebach. Apareció a los 6 pps; estas transiciones se caracterizan porque de cada n estímulos, $n-1$ disparan PA y el último se bloquea. En este caso de cada cuatro estímulos se producen tres PA. El espectro de potencias (panel D) presenta su armónico principal en la f.e. (6 Hz). La amplitud de los subarmónicos que son múltiplos de la f.e. (se muestra el de 12 Hz), disminuye más lentamente que lo observado para los subarmónicos del ritmo 1:1 de la *figura 1*. Se puede ver además que aparecen pequeños subarmónicos en frecuencias que no son múltiplos del armónico principal. Ellos se deben al uso de la FFT en regiones en que la serie de tiempo carece de señales, PA, por lo que el algoritmo introduce un armónico de frecuencias más baja que el principal, pero sin ser múltiplo de la f.e.

La transición tipo ráfaga fue encontrada 7 veces en 32 de los experimentos realizados. En el panel E puede verse uno de los patrones característicos de este tipo de transición. Nótese que la escala de tiempo está fuertemente comprimida para mostrar varias de las secciones con trenes de potenciales de acción con ritmo 1:1 (los más oscuros) y 2:1 (los más claros). Este patrón de actividad se encontró en el experimento que se toma para construir la figura a los 11 pps. El espectro de potencias de este tipo de transición es muy característico (panel F). Tiene picos en la f.e. y su mitad, ambos con una potencia comparable, pero lo más llamativo es que ambos picos se encuentran rodeados por muchos picos de menor tamaño, en frecuencias y con amplitudes irregulares, y que se agrupan alrededor de los dos primeros. Nuevamente, estos picos de menor tamaño son consecuencia del algoritmo empleado. Hay un pequeño grupo de armónicos de frecuencia muy baja, cercana a 0 Hz, que aparecen por la súbita alternancia de amplitudes entre los potenciales del ritmo 1:1 y el ritmo 2:1, lo que el método de Fourier traduce como una oscilación de muy baja frecuencia.

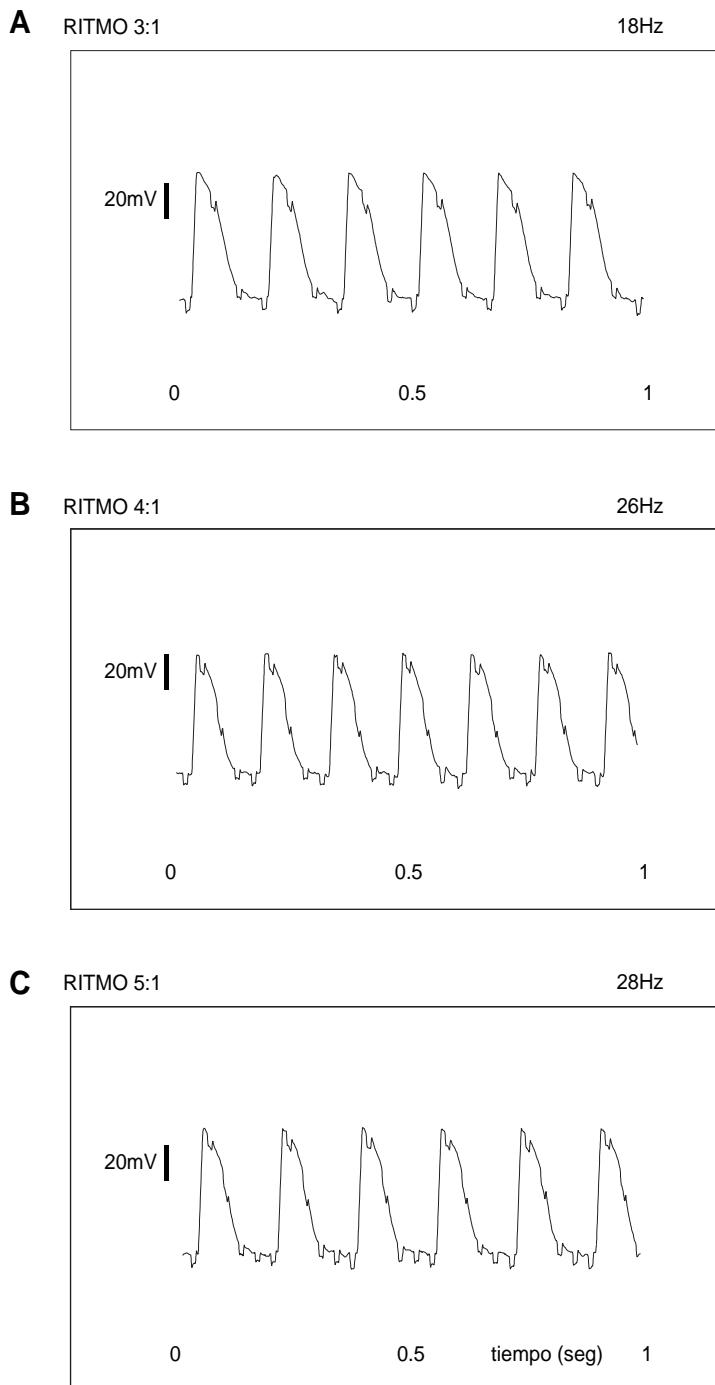


Fig. 3. Ritmos 3:1, 4:1 y 5:1. Series de PA a 18 pps en el panel A, a 26 en el panel B y a 28 en el panel C. El periodo efectivo entre PA es muy semejante a pesar de la fuerte disparidad entre las frecuencias de estimulación que se aplicaron.

Fenómenos de histéresis

Finalmente, pasaremos a describir nuestros resultados relativos a la ocurrencia de histéresis por cambios en la f.e., los cuales fueron obtenidos en 18 experimentos en los que se disminuyó pa-

latinamente la f.e. a partir del valor más alto alcanzado. En la *figura 5* desplegamos los puntos obtenidos a partir de los espectros de potencias de dos series experimentales con incremento y decremento gradual de la frecuencia. Al igual que en la *figura 2* cada punto representa la frecuencia del armónico principal obtenida a una cierta f.e. Los círculos marcan los datos obtenidos para incrementos de frecuencia, los triángulos aque-lllos en que la frecuencia se disminuyó. Las líneas continuas indican el sentido de “ida” y las líneas punteadas el recorrido de “vuelta”. En el panel A hemos repetido la gráfica desplegada en la *figura 2*, pero ahora incluyendo los resultados obtenidos en el descenso. Como puede verse el sistema visitó todos los ritmos tipo n:1, desde el 5:1 hasta el 1:1. Sin embargo no siempre se visitaron los mismos puntos. Esto llevó a que se produjeran tres regiones o “asas” de histéresis. Una entre los ritmos 5:1 y 4:1, otra entre los ritmos 4:1 y 3:1, y la mayor entre 2:1 y 1:1. En el panel B hemos desplegado un segundo grupo de resultados en el cual se forman sólo dos asas de histéresis. El producido entre los ritmos 1:1 y 2:1 tiene una forma muy semejante al asa respectiva en el panel A, sin embargo, en este caso la rama superior pertenece a la trayectoria de ida, mientras que en el panel A la rama superior corresponde al curso del regreso. En cuanto a la segunda asa, tiene una trayectoria relativamente irregular, que sin embargo resulta común en algunos de nuestros experimentos, su forma se explica porque al final del recorrido de ida el sistema llega a un estado de fatiga. Esto puede verse en el panel B: al final de la serie de puntos con ritmo 3:1, el sistema salta a los ritmos 4:1, 5:1 y 7:1 sin estabilizarse en ninguno de ellos. Al iniciar el regreso desde esta condición de aguda pérdida de excitabilidad, el sistema se recupera muy lentamente y consigue hacer contacto con algunos de los puntos de la respuesta inicial, hasta los 15 pps.

Discusión y conclusiones

El método de exploración de los patrones de respuesta basado en la FFT, tuvo como propósito inicial ayudar a la revisión de un gran volumen de datos; sin embargo, resultó una cómoda herramienta de prospección pues revela rápidamente los componentes esenciales de los patrones de actividad para series muy largas de datos. En particular en el caso de las transiciones por ráfagas, podría cuestionarse su aplicación si se trata de una serie de datos que no es estacionaria, sin

embargo consideramos la FFT sólo para precisar los dos componentes espectrales de la dinámica y corroborar su coexistencia para una misma condición experimental.

Existen hasta la fecha una gran cantidad de experimentos en sistemas cardiacos en los que se explora el efecto del incremento en la f.e.,^{9-11,21-26} en la mayoría de ellos los incrementos de fre-

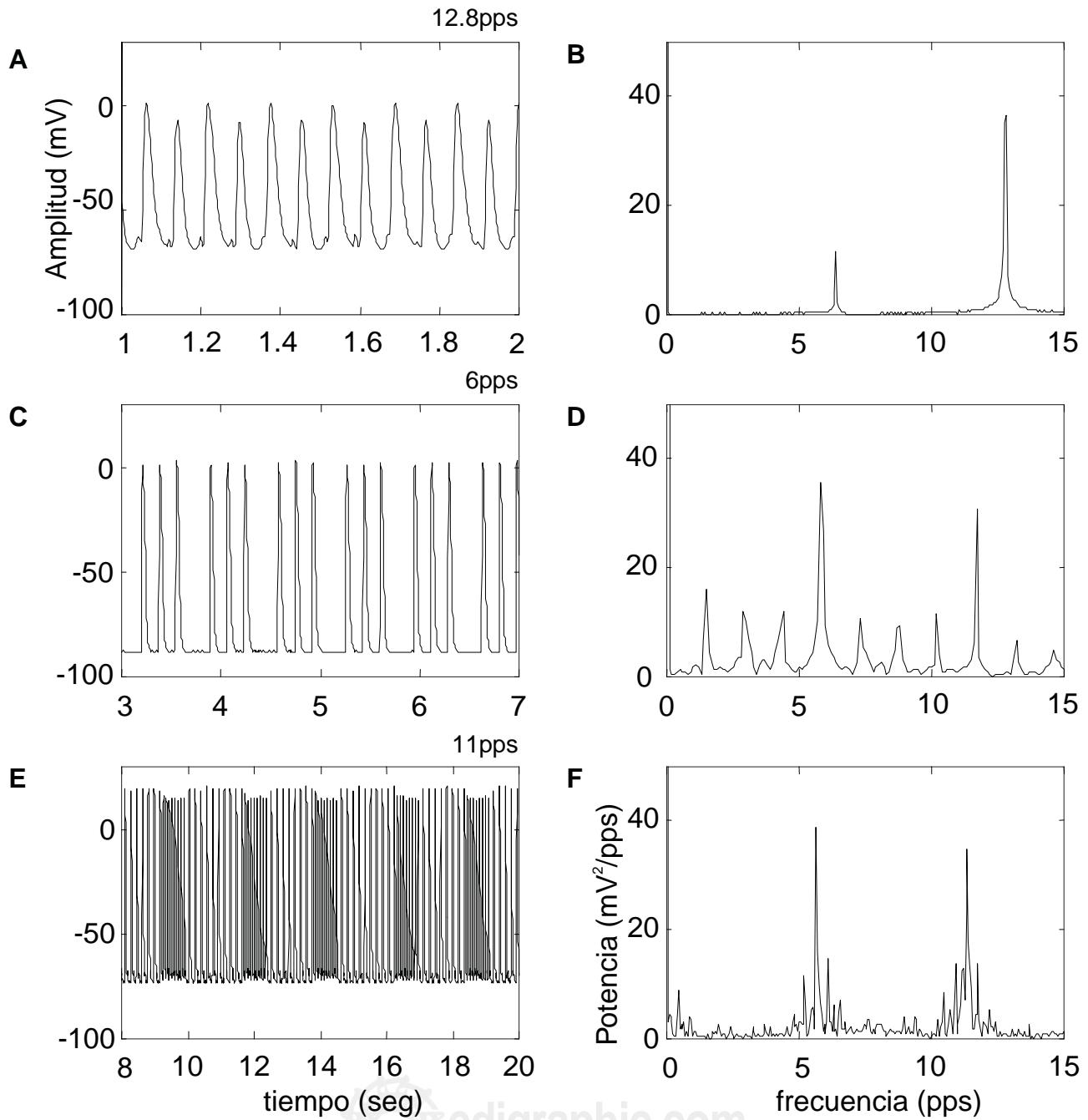


Fig. 4. Formas de transición indirecta entre los ritmos 1:1 y 2:1. Los paneles de la izquierda contienen los registros de PA y los de la derecha los espectros de potencia respectivos. **A.** Ritmo 2:2 o alternante obtenido a 12.8 pps. **B.** La frecuencia del armónico principal coincide con la de estimulación, además aparece un pequeño componente a la mitad de esta última. **C.** Registro tipo Wenckebach con periodicidad cada cuatro estímulos, encontrado a 6 pps de f.e. **E.** A una escala de tiempo muy cerrada se despliega el resultado más interesante de esta figura: un patrón de transición por “ráfagas” obtenido a 11 pps. Trenes de PA que exhiben ritmo 1:1 se intercalan con trenes de ritmo 2:1, el sistema salta *espontáneamente* de uno a otro. **F.** El espectro de potencia es muy característico, consta de picos bien definidos que caen en la f.e. y su medio, y se ven picos menores agrupados irregularmente en derredor.

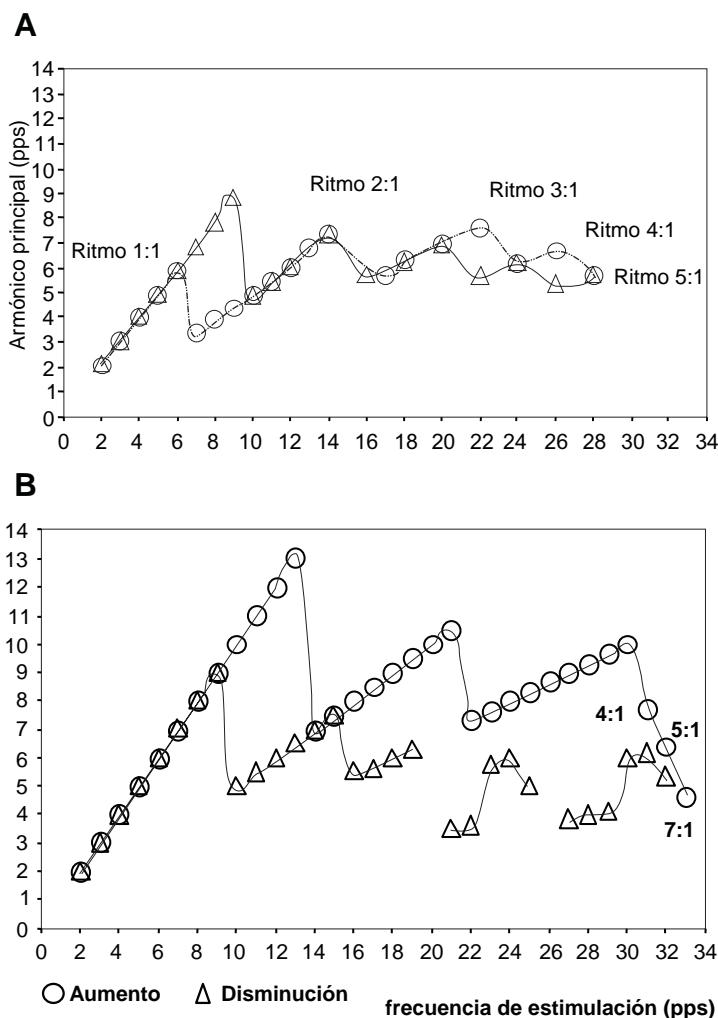


Fig. 5. Histéresis por frecuencia en el papilar de cobayo. Excusiones de incremento y decremento en la f.e. Datos extraídos de los períodos de 30 segundos a f.e. constante. Las abscisas corresponden a la f.e. y las ordenadas a la frecuencia del armónico principal. Los círculos indican a las frecuencias aplicadas durante la fase de incrementos y los triángulos la fase de disminución. Las líneas marcan el sentido de la variación de la frecuencia. En el panel A los datos se agrupan en tres regiones o asas de histéresis, mientras que en el panel B se forman sólo dos, una de ellas de forma irregular. La forma de las asas depende de la manera en que se alcance la frecuencia más alta de estimulación durante la fase de aumento.

cuencias no son muy altos básicamente porque las frecuencias que tienen importancia clínica no son extremadamente altas. Por ejemplo en el caso de la fibrilación auricular en el corazón humano, las frecuencias más altas de las que se estaría hablando serían los 10 pulsos por segundo.²⁷ Sin embargo, la exploración de un sistema en un amplio rango de frecuencias, que incluya valores muy altos permite observar efectos que se encuentran enmascarados en las frecuencias bajas, pero que pueden tener un papel muy impor-

tante en la dinámica cardíaca. Así en el caso de este reporte nos encontramos con el incremento y decremento de frecuencia múltiples ritmos n:1 (*Fig. 3*), que presentan diversas zonas de histéresis. La forma de esas regiones está fuertemente determinada por la manera en que se llega a las frecuencias más altas durante cada corrida experimental. Conviene recordar que un sistema capaz de desarrollar histéresis implica la posibilidad de por lo menos dos modos o estados para funcionar, es decir, implica biestabilidad dinámica. Con lo cual tendríamos ya una huella en este resultado de la posibilidad de por lo menos dos modos o ritmos para responder a una misma condición de actividad, cuya manifestación depende de la actividad previa del sistema.

Varios trabajos de la literatura del área reportan histéresis en sistemas experimentales, por ejemplo en células aisladas de aurícula de conejo,¹¹ en ventrículo de rana,^{28,29} en corazones enteros de perros,³⁰ en el umbral de estimulación de marcapasos artificiales³¹ y en varios otros sistemas. Histéresis por frecuencia se ha reportado en cuatro especies: rana,²⁹ perro,³⁰ cardiomiocitos embrionarios de pollo^{3,32} y conejo.¹¹ En los cuatro trabajos antes mencionados el asa de histéresis ocurrió entre los ritmos 1:1 y 2:1. En nuestro caso tenemos varias asas consecutivas, ocurriendo la más amplia entre los ritmos 1:1 y 2:1. Observamos además que la histéresis puede ocurrir de manera positiva o negativa, correspondiendo la rama superior de la gráfica al ritmo 1:1 o al 2:1, esto es, la transición del sistema al ritmo alternativo 2:1 puede alcanzarse durante la excusión de incremento de frecuencias o durante la disminución. Las siguientes asas pueden tomar distintas formas. En el panel A de la *figura 5* mostramos un caso en que las asas van ocurriendo prácticamente entre todos los ritmos n:1 consecutivos. En el panel B sólo existe un asa entre el ritmo más alto alcanzado y el ritmo 2:1.

Se sabe que la actividad de alta frecuencia aumenta la concentración de potasio extracelular^{31,32} depolarizando la membrana y reduciendo la excitabilidad. En el caso de la corrida experimental mostrada en el panel A de la *figura 5*, el sistema se mantuvo un total de 360 segundos en las frecuencias altas a partir de que se le estimuló a 10 pps. En el caso de la corrida ilustrada en el panel B de la misma figura, el sistema estuvo 750 segundos en las frecuencias altas del mismo intervalo de frecuencias. De manera que en el segundo caso el sistema habría expulsado más

potasio a su medio extracelular, quedando en un estado más deprimido para cuando se inician los decrementos de frecuencia, provocando con ello que el sistema haga contacto con los puntos originales sólo después de 480 segundos de iniciada la disminución de frecuencia.

Pocos reportes refieren ritmos tipo n:1 con n mayor a tres. Sabemos de un reporte para células embrionarias de pollo en que se llegó al ritmo 4:1. En un trabajo con fibras de Purkinje, en el cual la intensidad del estímulo se incrementó y decrementó por pasos,⁷ se mencionan ritmos con relación de hasta 12:1. Una razón de esta ausencia de reportes con ritmos n:1 de bajo índice de respuesta, puede ser la arbitrariedad con que se define si se trata de ritmos n:1 o n:0, pues en muchas ocasiones la respuesta obtenida no es claramente una espiga o su ausencia, sino que se observan pequeñas deflexiones en el registro de V_m, y lo que para un investigador puede ser un PA deprimido, para otro puede ser una respuesta subumbral. De cualquier manera, consideramos que nuestros resultados muestran que el desarrollo de ritmos tipo n:1 con n creciente debido a incrementos de la frecuencia, y con la ocurrencia de varias asas de histéresis consecutivas, es una propiedad general de los sistemas cardíacos, que se ha reportado poco porque no se lleva a los sistemas hasta frecuencias altas de estimulación, y que revela las capacidades multiestables de estos tejidos.

Otro resultado importante que reportamos en este trabajo es el patrón de “transición por ráfagas”. Chialvo y Jalife en un trabajo con fibras de Purkinje de perro,¹² analizan los patrones de respuesta ante variaciones en la intensidad del estímulo aplicado, describen entre otras, la secuencia de patrones 1:1, 3:2, 5:3, 2:1, 3:1, 4:1 y 1:0; la cual sigue la predicción de la Secuencia de Farey, observada universalmente en los sistemas oscilantes. Dentro de su segunda figura presentan un panel que describen como fluctuaciones recurrentes ante la aplicación de pulsos constantes de 20 ms de duración y frecuencia de 2 pps que se mantienen durante casi 20 segundos, sólo se refieren a él como un patrón inestable que se repite cada 40 ó 50 latidos. En nuestro sistema este tipo de patrón fue observado repetidamente y dentro de un intervalo definido de frecuencias, como una forma de transición entre dos patrones específicos, 1:1 a 2:1 o bien entre 2:1 y

3:1 (datos no mostrados), prefigurando siempre el desarrollo de una inestabilidad anterior a una transición. Este comportamiento puede pensarse como debido a oscilaciones en la concentración del potasio exterior, que reflejan a su vez un acoplamiento: el ritmo de PA y la cinética de la bomba sodio-potasio. Varios reportes muestran que con el incremento de la frecuencia de trabajo la diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular para la célula en reposo se hace más positiva, lo cual se explica como consecuencia del incremento del potasio extracelular.³⁴ Diversos planteamientos teóricos³⁵⁻³⁶ y resultados experimentales,⁸ muestran que con el incremento de potasio extracelular o isquemia creciente se inducen la aparición de ritmos 2:1. En nuestros experimentos, cuando efectuamos los incrementos en la f.e., provocamos aumentos en la concentración de potasio extracelular, estos incrementos se producirían porque durante la fase de repolarización cada PA estaría inyectando potasio al medio extracelular. Cuando la concentración de potasio es tan alta que no puede ser compensada por la bomba de sodio-potasio, se induce un ritmo 2:1. La aparición de este ritmo produce que la pérdida de potasio por la célula se reduzca a la mitad, pues ahora tenemos un potencial de acción por cada dos estímulos. Esta reducción en el aporte de potasio da una oportunidad a la bomba de sodio-potasio para reducir la concentración externa. Si ésta es suficientemente baja, se recuperan las condiciones que hacen posible el ritmo 1:1 y el mecanismo que produce el incremento en el potasio externo opera nuevamente. Sin embargo, la existencia de este tipo de comportamiento debe aún ser confirmada, para éste y otros sistemas experimentales de tejido cardíaco.

Por otro lado, a nivel celular el perfil específico de un PA ante un estímulo está determinado fundamentalmente por el nivel de polarización de la membrana, las constantes cinéticas de las corrientes iónicas involucradas, el grado de recuperación de las mismas conductancias y por la conectividad específica del tejido en estudio, así se combinan variables con determinaciones temporales muy distintas en el momento de recibir un pulso de estimulación. La fase rápida de depolarización es debida a una entrada súbita de sodio cuyas constantes cinéticas han sido estudiadas con detalle, con la salvedad de que esta caracte-

rización se ha hecho mayoritariamente bajo condiciones estacionarias, con la aplicación de pulsos de voltaje comparativamente largos. No obstante, en estudios recientes con técnicas de fijación de voltaje empleando pulsos que simulan los PA durante fibrilación ventricular,³⁷ se ha visto que las propiedades cinéticas del canal bajo estas condiciones son otras, y que es posible obtener espigas de voltaje importantes para niveles considerablemente depolarizados de la membrana (-10 mV) con un desplazamiento de la curva de activación de casi 10 mV, con el mismo protocolo se ha encontrado que la corriente rápida de sodio (I_{Na}) es evidente para intervalos de descanso tan reducidos como 20 ms.³⁷ Los autores concluyen que los períodos de descanso, la duración de la depolarización de la membrana y el potencial de membrana influyen en la activación, inactivación y recuperación de la inactivación de los canales rápidos de sodio. Todo esto resulta poco intuitivo si se consideran las propiedades de estos canales obtenidas bajo condiciones estables.

Si la imagen actual que podemos hacernos sobre las propiedades de la I_{Na} en tejido cardíaco, es que su activación, inactivación y recuperación de la inactivación están influidas por los períodos de descanso, la duración de la depolarización de la membrana y el potencial de membrana, es decir, por el patrón de actividad previo, tendríamos que considerar que las espigas que se registran en nuestros resultados, con estimulación a alta frecuencia, pueden contener un componente considerable de la I_{Na} , a pesar de encontrarse la membrana notablemente depolarizada. Podríamos pensar que un cambio súbito de ritmo, con pérdida de uno o más PA, se alcanza cuando repentinamente el número de canales disponibles para ser activados a alta frecuencia no llega al mínimo requerido en una condición de por si constreñida, lo cual estaría ocurriendo en los ritmos n:1 con n > 1.

También se han estudiado las condiciones de activación e inactivación de los canales de potasio dependientes de voltaje, responsables de la repolarización de las células cardíacas (I_K), determinantes en la regulación de la duración PA. Se sabe que las cinéticas de desactivación inclusive de los canales de potasio rápidos (I_{Kr}), son más lentas que en el músculo esquelético o en neuronas.^{38,39} Se ha descrito además una corriente de potasio llamada de fondo, activa durante la meseta del PA de miocitos ventriculares del co-

bayo, pero con cierta distribución regional y hay evidencia de que su activación influye en la duración del PA. Otros autores han señalado que las tasas rápidas de activación del tejido cardíaco, conducen a una desactivación incompleta de los canales de potasio (o a una acumulación de activación), que en consecuencia permanecen abiertos, aumentan la tasa de repolarización y reducen la duración de la meseta de depolarización.^{39,40} Esto explicaría el progresivo acortamiento variable observado en la duración de los PA obtenidos en nuestros resultados mediante estimulación a alta frecuencia.

La distribución inhomogénea de los propios canales I_{Kr} e I_{Ks} , no sólo transmural, sino local, contribuye a dispersar la repolarización del tejido ventricular.⁴¹ El resultado es que las células con menor densidad de canales presentan prolongación de la duración del PA a baja f.e. y mayor robustez ante los cambios de frecuencia, mayor adaptación. En condiciones de baja densidad del I_{Ks} la corriente I_{Na-Ca} cobra mayor relevancia en este proceso de adaptabilidad. Dado que nuestros registros son unicelulares, en diferentes experimentos podemos empalar células con diferentes densidades de canales de potasio y esto explicar en alguna medida la variedad de patrones observada.

Otro factor determinante en la adaptación a la f.e. es el grado de acoplamiento eléctrico entre las células. Considerando células bien acopladas, longitudinalmente, la dispersión máxima que se ha medido llega a 18 ms, si el grado de acoplamiento se reduce un factor de 10, como ocurre transversalmente, la dispersión de la duración de los PA alcanza 44 ms. En nuestras condiciones de registro intra y unicelular, no podríamos valorar este factor, sin embargo en algunos experimentos con registro simultáneo proximal y distal hemos encontrado casos con ritmos y secuencias idénticas y otros en los que hay divergencias (resultados no presentados), los cuales sugerían diferentes grados de acoplamiento entre las células.

La descripción del fenómeno de ritmidad cardíaca es a fin de cuentas un problema de organización global que depende de propiedades locales fundamentales como la tasa de depolarización o la inactivación de las conductancias iónicas, y globales o extendidas como el grado de acoplamiento electrotónico entre las células. Puesto que los estudios que logran una mejor caracterización de estas propiedades básicas se hacen en células dispersas y casi siempre bajo

condiciones estacionarias, no se tiene una imagen clara de los fenómenos agregados cuando se considera la propagación y la conectividad inhomogénea que prevalece en el tejido cardíaco. Se han propuesto entonces modelos que reúnen estas variables en una sola función monotónica, la Curva de Restitución Eléctrica, y con ella se ha buscado predecir la actividad de un sistema cardíaco según el régimen de trabajo a que se somete y por las características de sus respuestas previas.⁴² Sin embargo, estos modelos no logran explicar fenómenos más complejos, como las bifurcaciones con doblamiento del periodo o dinámicas muy irregulares.

Otro grupo de investigadores^{43,44} destaca que la determinación de la duración de un PA no se limita a la condiciones finales del ciclo inmediato anterior, sino que debe rastrearse a dos o tres ciclos previos, para incorporar esta influencia han introducido la noción de memoria, un factor que se acumula durante el PA y se disipa durante los períodos de descanso. Estos modelos buscan simplificar la representación de la dinámica cardíaca, así como ampliar su potencialidad predictiva, y sin embargo requieren aún de 13 o más ecuaciones diferenciales acopladas que representen las interacciones del potencial de membrana y las corrientes iónicas. Los nuevos modelos de mapeos sobre un diagrama de fases construido a partir de la duración del PA, el intervalo de descanso y el período de estimulación, predicen las dinámicas regulares, irregulares y las inestabilidades

que conducen a estas últimas. Un fenómeno de esta naturaleza, de acumulación o memoria, podría explicar los procesos de histéresis que hemos descrito en este trabajo.

En conclusión, el estudio que hemos realizado del comportamiento del músculo papilar de cobayo bajo estimulación en un amplio intervalo de frecuencias, con incrementos y decrementos paulatinos, nos ha permitido encontrar sucesiones de ritmos tipo n:1, con índice de actividad decreciente a medida que aumenta la f.e. Estos ritmos muestran regiones de histéresis consecutivas, cuya forma específica es muy sensible a la manera en que se alcanzan las frecuencias más altas de estimulación. Entre los ritmos n:1 se pueden ver distintas formas de transición, en particular reportamos por primera vez, la “transición por ráfagas”, que consiste en la oscilación espontánea entre dos ritmos cuando el sistema está sujeto a la misma f.e. Tanto el fenómeno de histéresis como la transición por ráfagas reflejan una interrelación muy compleja entre los distintos factores de los que depende el disparo de potenciales de acción. Sería conveniente explorar la pertinencia de los modelos de mapeo con memoria para describir resultados como los aquí mostrados.

Agradecimientos. Los autores agradecen el apoyo brindado por el CONACYT a través del Proyecto 32164-E y del PAPIME-UNAM 191054. Así como el apoyo técnico del Biol. Jaime García R.

Referencias

1. WANG DW, VISWANATHAN PC, BALSER JR, GEORGE AL, BENSON DW: *Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block.* Circulation 2002; 105:341-346.
2. GLASS L, MACKEY M: *Periodic stimulation of biological oscillators* En From clocks to chaos. The rhythms of life. N.Y. Princeton University Press 1988.
3. GUEVARA MR, SHRIER A, GLASS L: *Chaotic and complex cardiac rhythms.* En Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside DP Zipes, J. Jalife 1st edition. Philadelphia. W.B Sanders, 1990, pp 192-201.
4. VINET A, CHIALVO D, JALIFE J: *Irregular dynamics of excitation in biologic and mathematical models of cardiac cells.* Ann NY Acad Sci 1990; 591: 281-298.
5. ANUMONWO JMB, DELMAR M, VINET A, MICHAELS DC, JALIFE J: *Phase resetting and entrainment of pacemaker activity in single sinus nodal cells.* Circ Res 1991; 68: 1138-1153.
6. BERNE RM, LEVY MN: *Electrical activity in the heart.* En Physiology. N.Y. Mosby Year Book. 3rd Ed. 1993 pp 383.
7. LORENTE P, DAVIDENKO J: *Hysteresis phenomena in excitable cardiac tissue.* Ann NY Acad. Sci. 1990; 591:109-127
8. DILLY SG, LAB MJ: *Electrophysiological alternans and restitution during acute regional ischaemia in myocardium of anaesthetized pig.* J Physiol (London) 1988; 402: 315-333.
9. SAVINO GV, ROMANELLI L, GONZÁLEZ DL, PIRO O, VALENTINUZZI ME: *Evidence for chaotic behavior in driven ventricles.* Biophys J 1989; 56: 273-280.
10. GILMOUR RF Jr., WATANABE MA, OTANI NF: *Restitution properties and dynamics of reentry.* En (DP Zipes J Jalife eds): *Cardiac Electrophysiology.*

- From cell to bedside.* 3rd Edition. WB Saunders Co. Philadelphia. 2000:378-385.
11. YEHIA AR, JEANDUPEUX D, ALONSO F, GUEVARA MR: *Hysteresis and bistability in the direct transition from 1:1 to 2:1 rhythm in periodically driven single ventricular cells.* Chaos 1999; 9: 916-931.
 12. CHIALVO D, JALIFE J: *Non-linear dynamics of cardiac excitation and impulse propagation.* Nature 1987; 330: 749-752.
 13. GEDES LA, BAKER LE, MOORE AG. *Optimum electrolytic chloriding of silver electrodes.* Medical and Biological Engineering 1969; 7: 49-56. N.Y.
 14. KAUFMAN ES, MACKALL JA, JULKA B, DRABEK C, ROSENBAUM DS: *Influence of heart rate and sympathetic stimulation on arrhythmogenic T wave alternans.* Am J Physiol (Heart Circ Physiol) 2000; 279: H1248-H1255.
 15. ROSENBAUM DS, ALBRECHT P, COHEN RJ: *Predicting sudden cardiac death from T wave alternans of the surface electrocardiogram: promise and pitfalls.* J Cardiovasc Electrophysiol 1996; 7: 1095-1111.
 16. HACHIBANA H, KUBOTA I, YAMAKI M, WATANABE T, TOMOIKE H: *Discordant S-T alternans contributes to formation of reentry: a possible mechanism of reperfusion arrhythmia.* Am J Physiol 1998; 275: H116-H121.
 17. GUEVARA MR, ALONSO F, JEANDUPEUX D, VAN GINNEKEN ACG: *Alternans in periodically stimulated isolated ventricular myocytes: experiment and model.* En Cell to Cell signaling: from experiments to theoretical models. Edited by A. Golb-dbeter (Harcourt Brace Jovovich) London 1989, pp 551-563.
 18. ROSENBLUETH A: *A mechanism of the Wenckebach-Luciani cycles.* Am J Physiol 1958; 194: 491-494.
 19. DELMAR M, MICHAELS DC, JALIFE J: *Slow recovery of excitability and the Wenckebach phenomenon in the single guinea pig ventricular myocyte.* Circ Res 1989; 65: 761-774.
 20. JALIFE J: *The sucrose gap preparation as a model of AV nodal transmission: Are dual pathways necessary for reciprocation and AV nodal echoes?* PACE 1983; 6: 1106-112.
 21. JOYNER RW, RAMSA BM, TAN RC: *Effects of stimulation frequency on P-V conduction.* Ann NY Acad Sci 1990; 591: 38-50.
 22. TAKAHASHI IM, ISHIDA S, FUJINO T, NAKAGAWA M, YONEMOCHI H, IWAO T, ET AL: *Preceding stimulus frequency-dependent potentiation of the postrest shortening of the action potential duration in rabbits.* Jpn Heart J 2000; 41(4): 481-92.
 23. BRIXIUS K, HOISCHEN S, LASEK K, SCHWINGER RH: *Force/shortening-frequency relationship in multicellular muscle strips and single cardiomyocytes of human failing and nonfailing hearts.* J Card Fail 2001; 7(4): 335-41.
 24. BLUHM WF, MEYER M, SWANSON EA, DILLMANN WH: *Postrest potentiation of active force in mouse papillary muscles is greatly accelerated by increased stimulus frequency.* Ann N Y Acad Sci 1998; 685: 304-7.
 25. HAYASHI H, PONNAMBALAM C, MACDONALD TF: *Arrhythmic Activity in Reoxygenated Guinea Pig Papillary Muscles and Ventricular Cells.* Circ Res 1987; 61: 124-133.
 26. ATTWELL D, COHEN I, EISNER A: *The effects of heart rate on the action potential of guinea-pig and human ventricular muscle.* J Physiol 1981; 313: 439-461.
 27. NATTEL S: *New ideas about atrial fibrillation 50 years on.* Nature 2002; 415: 219-226.
 28. MINES GR: *On dynamic equilibrium in the heart.* J Physiol (Lond) 1913; 46: 349-382.
 29. HALL GM, BAHAR S, GAUTHIER J: *Prevalence of rate-dependent behaviors in cardiac muscle.* Phys Rev Lett 1999; 82: 2995-2998.
 30. MOULPOULOS SD, KARDARAS N, SIDERIS DA: *Stimulus-response relationship in dog ventricle in vivo.* Am J Physiol 1965; 208: 154-157.
 31. BAND T, IWA T, MISAKI T, SAKURAI J: *Development of automatic threshold analyzer.* Proceedings of the V World Symp. Cardiac Pacing. (PACESYMP, Montreal 1979) Capítulos 28-29.
 32. GUEVARA MR: *Chaotic cardiac dynamics.* Doctoral Thesis. McGill University, Montreal, 1984.
 33. PASMOOI JH, VAN EST GC, BOUMAN LN, ALLESSIE MA, BONKE FIM: *The effect of heart rate on the membrane responsiveness of rabbit atrial muscle.* Pflügers Archiv 1976; 366: 223-231.
 34. KUNZE DL: *Rate-dependent changes in extracellular potassium in the rabbit atrium.* Circ Res 1977; 41(1): 122-127.
 35. ARCE H, LOPEZ A, GUEVARA MR: *Triggered alternans in an ionic model of ischemic cardiac ventricular muscle.* Chaos 2002; 12: 807-818.
 36. ARCE H, XU A, GONZALEZ H, GUEVARA MR: *Alternans and higher-order rhythms in an ionic model of a sheet of ischemic ventricular muscle.* Chaos 2000; 10: 411-426.
 37. UJHELYI MR, CREAZZO TL: *Action Potentials That Mimic Fibrillation Activate Sodium Current.* J Mol Cell Cardiol 1999; 31: 1673-1684.
 38. BACKX P, MARBAN E: *Background potassium current active during the plateau of the action potential in guinea pig ventricular myocytes.* Circulation 1993; 72: 890-900.
 39. ZENG J, LAURITA KR, ROSENBAUM DS, RUDY Y: *Two components of the delayed rectifier K⁺ current in ventricular myocytes of the guinea pig type: theoretical formulation and their role in repolarization.* Circ Res 1995; 77: 140-152.
 40. JURKIEWICZ NK, SANGUINETTI MC: *Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent: specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide.* Circ Res 1993; 72: 75-83.

41. PRAKASH CV, ROBIN MS, RUDY YORAM: *Effects of I_{Kr} and I_{Ks} heterogeneity on action potential duration and its rate dependence. A simulation study.* Circulation 1999; 99: 2466-2474.
42. BOYETT MR, JEWELL BR: *A study of the factors responsible for the rate-dependent shortening of the action potential in mammalian ventricular muscle.* J Physiol (Lond) 1978; 285: 359-380.
43. OTANI NF, GILMOUR RF JR.: *Memory models for the electrical properties of local cardiac systems.* J Theor Biol 1997; 187: 409-436.
44. FOX JJ, BODENSCHATZ E, GILMOUR RF JR.: *Period-doubling instability and memory in cardiac tissue.* Physical Review Letters. 2002; 89(13): 8101-4.

