

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Programa de Doctorado:

190 D - Ciencias Aplicadas al Deporte

Titulo del trabajo de investigación

ANÁLISIS DE ALGUNOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y
CARDIOVASCULARES DE ENTRENAMIENTO EN UN
MODELO DE EJERCICIO FÍSICO CRÓNICO. ESTUDIO
EXPERIMENTAL.

nº de créditos: 12

Alumno: D. Germán Parra Giraldo

Director del Trabajo: Prof. Dr. D. Luis Such Miquel

Tutor: Prof. Dr. D. Luis Such Belenguer

Valencia, 27 de julio de 2007

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

D. Luis Such Miquel. Profesor del Departamento de Fisioterapia de
la Universidad de Valencia

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado:

ANÁLISIS DE ALGUNOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y
CARDIOVASCULARES DE ENTRENAMIENTO EN UN MODELO
DE EJERCICIO FÍSICO CRÓNICO. ESTUDIO EXPERIMENTAL.

Ha sido realizado bajo mi dirección por el alumno: **D. Germán Parra
Giraldo**

Valencia, 27 de julio de 2007

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.2. JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	4
1.2.1 Protocolos de experimentación y especies animales usadas hasta la actualidad	4
1.2.1.1. Protocolos en ratas	4
1.2.1.2. Protocolos en perros	10
1.2.1.3. Protocolos en cerdos	13
1.2.1.4. Protocolos en conejos	18
1.2.2. Parámetros de entrenamiento usados	25
1.2.2.1. Citrato sintasa	25
1.2.2.2. Capacidad de trabajo físico	27
1.2.2.3. Consumo máximo de oxígeno	28
1.2.2.4. Frecuencia cardiaca	29
1.2.2.5. Lactato en plasma	31
1.2.2.6. Índice peso corporal / peso del corazón	31
1.2.2.7. Temperatura rectal	32
1.2.2.8. Superóxido dismutasa	32

1.2.3. Estudio especial de los protocolos de entrenamiento usados por nuestro grupo de investigación	33
1.2.4 Hipótesis de trabajo	33
1.2.5. Plan de trabajo	35
2. MATERIAL Y MÉTODOS	37
2.1. MATERIAL	39
2.1.1. Animales de experimentación	39
2.1.2. Reactivos	39
2.1.3. Aparatos	40
2.2. MÉTODOS	42
2.2.1. Protocolo de entrenamiento	42
2.2.2. Preparación experimental del estudio electrofisiológico	44
2.2.3. Parámetros estudiados y determinación de los mismos	46
2.2.3.1. Definición de los parámetros	46
2.2.3.2. Determinación de los parámetros	47
2.2.4. Grupos de estudio	52
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
2.4. LEGISLACIÓN	53

3.	RESULTADOS	55
3.1.	FRECUENCIA CARDIACA <i>IN VIVO</i>	57
3.2.	FRECUENCIA CARDIACA <i>IN VITRO</i>	58
3.3.	CONCENTRACIÓN DE LACTATO EN SANGRE VENOSA	58
3.4.	EXPRESIÓN DE LA OXIDO NÍTRICO SINTASA, iNOS Y DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO, HSP60	60
4.	DISCUSIÓN	63
4.1.	ALGUNAS CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	65
4.2.	RESPECTO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS	66
4.2.1.	Frecuencia cardíaca <i>in vivo</i>	66
4.2.2.	Frecuencia cardíaca <i>in vitro</i>	67
4.2.3.	Concentración de lactato en sangre venosa	69
4.2.4.	Expresión de la oxido nítrico sintasa, iNOS y de la proteína de choque térmico, HSP60	71
5.	CONCLUSIONES	75
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVOS.

Analizar en conejos los efectos de la aplicación de un protocolo de ejercicio físico sobre una serie de parámetros bioquímicos y electrofisiológicos miocárdicos tras el periodo de entrenamiento en situación de reposo. Estos parámetros han sido:

a) Bioquímicos: Concentración de lactato en sangre, expresión de la proteína de choque térmico *-heat shock protein-* (HSP60) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

b) Cardiovasculares: Automatismo sinusal

- En el corazón *in situ*
- En el corazón *in vitro*

Todo ello se pretende realizar con el fin de establecer un cierto nivel de caracterización del protocolo de entrenamiento aeróbico usado habitualmente en nuestro grupo de trabajo para la realización de investigaciones acerca de los efectos electrofisiológicos del ejercicio físico crónico.

1.2. JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

1.2.1. Protocolos de experimentación y especies animales usadas hasta la actualidad.

1.2.1.1. Protocolos en ratas:

Bedford y Tipton (1987), entrenaron a ratas durante 11 - 14 semanas a una duración, velocidad e inclinación de la cinta progresivas, a una intensidad del 70 - 90 % del $\dot{V}O_2$ máx durante 40 - 50 minutos y con carreras intercaladas de 5 minutos a una velocidad de 1,6 - 1,9 km/h y una inclinación del 15 %, repetida 5 veces; todo esto con el objetivo de observar el efecto del entrenamiento de resistencia sobre la actividad barorefleja del seno carotídeo.

Locke *et al.* (1995), hicieron correr en un *treadmill* a 0° de inclinación durante 0, 20, 40 y 60 minutos o hasta la fatiga, a 5 ratas a una velocidad de 24 m/min, con el propósito de examinar si tenía lugar la activación del Factor (de transcripción), de Choque Térmico (SHF) en el miocardio durante ejercicio.

Powers *et al.* (1998), examinando el efecto del entrenamiento de resistencia en las respuestas fisiológicas y bioquímicas cardíacas durante la isquemia y reperfusión, entrenaron 30 ratas en cinta rodante a una intensidad del 75 - 80 % del consumo máximo de oxígeno (VO_2 máx), con velocidad progresiva desde 25 hasta 30 m/min y con un grado de inclinación entre 0 - 18 % durante 10 semanas, 4 veces por semana, 90 minutos al día. Demirel *et al.* (1998), utilizó el mismo protocolo con el fin de demostrar que el entrenamiento de resistencia reduce la peroxidación lipídica miocárdica en un modelo de isquemia-reperfusión.

Bonen (2000), utilizó dos protocolos, uno de intensidad moderada (21 m/min al 8% de inclinación) y otro de alta intensidad (31 m/min al 15% de inclinación) durante 3 semanas, con el ánimo de examinar el comportamiento de los transportadores de monocarboxilato y el consumo de lactato en músculo esquelético y corazón.

Spier *et al.* (1999), analizaron el efecto del ejercicio crónico y agudo en la respuesta vasoconstrictora de la aorta abdominal en ratas macho, las cuales fueron entrenadas en un único día y en 1, 2, 4 y 10 semanas durante una hora, a una intensidad de 30 m/min

de velocidad y 15° de inclinación del tapiz rodante.

Taylor *et al.* (1999), con el objetivo de determinar los efectos del ejercicio agudo sobre la recuperación miocárdica después de una isquemia y de la expresión de la proteína de choque térmico, pusieron a correr en cinta rodante a varias ratas hembra por uno o tres días durante 100 minutos, a una velocidad de 20 m/min y una inclinación de 6°, con una temperatura del cuarto de 23 - 24 °C.

Juel (2000), con el fin de evaluar el efecto de 3 semanas de entrenamiento sobre la expresión de la variedad isomorfa del intercambiador Na^+/H^+ (NHE1) en músculo esquelético rojo y blanco, utilizó 5 ratas macho, las cuales ejercitó a doble sesión por día en 3 series de 3 minutos con un minuto de descanso. La velocidad e inclinación de la cinta iba desde 15 m/min al 9 % la primera semana hasta 40 m/min al 18 % la última.

Tagarakis *et al.* (2000), utilizando ratones hembra, las sometieron a 3 ó 6 semanas de entrenamiento de 30 minutos con aumento progresivo de la velocidad hasta los 33 m/min con una inclinación del tapiz del 3 %, para cuantificar el nivel de deterioro de la base capilar cardiaca durante ejercicio sometida a dosis de

testosterona-propionato.

Mattson *et al.* (2000), hicieron correr ratas sobre un *treadmill* hasta que pudieran mantenerse en carrera durante 60 minutos, y luego conservaron una velocidad constante de 27 m/min a una inclinación del 10 % hasta completar 8 semanas de entrenamiento, con el objetivo de examinar la relación entre la proteína de choque término (HSP60), la proteína reguladora de glucosa (GRP75) y el potencial oxidativo del músculo esquelético a través de la actividad de la citrato sintasa.

Wisløff *et al.* (2001), entrenaron ratas para evaluar la función contráctil y la expresión de los genes asociados con la regulación intracelular del calcio tras someterlas a un entrenamiento aeróbico de resistencia, teniendo como parámetro de intensidad el (VO_2 máx), previamente validado por ellos mismos. Fueron entrenadas 2 horas por día en un tapiz rodante a 25° de inclinación; iniciando con un calentamiento de 20 minutos al 40 - 50 % del VO_2 máx y posteriores intervalos de 8 minutos al 85 - 90 % y 2 minutos al 50 - 60 % alternativamente.

Barbier *et al.* (2004), con el fin de observar los efectos del

entrenamiento de resistencia en algunos receptores adrenérgicos y en la densidad de los receptores muscarínicos en corazones de ratas, fueron sometidas 9 hembras a un protocolo de carrera continua de intensidad progresiva, entre 14 - 19 m/min de velocidad y 10 - 12° de inclinación del *treadmill*, durante 6 semanas y 2 más a un *interval-training* de 20 minutos de calentamiento a 20 m/min y 10 períodos de aceleraciones de 25 m/min (con recuperaciones de un minuto a 15 m/min) y 20 minutos finales a 17m/min, todos a 10° de inclinación del *treadmill*.

Hayward *et al.* (2004), sometieron ratas hembra a un régimen de ejercicio de 8 semanas, 30 minutos por día a una velocidad de 20 - 25 m/min y una inclinación del *treadmill* del 15 %, con el propósito de determinar si el entrenamiento físico mejoraba la vasodilatación dependiente de endotelio después de la exposición a quimioterapia en cáncer mamario.

Martins *et al.* (2005), investigaron los efectos del entrenamiento físico y de la hipertensión sobre la expresión de la oxitocina y del receptor de esta hormona. Para ello, usaron ratas a las que entrenaron en *treadmill*, aplicando como criterio de intensidad de ejercicio, la que significaba un 50 a 60 % de su capacidad máxima,

determinada a partir de la tensión arterial y la frecuencia cardiaca. El entrenamiento, realizado durante 12 semanas, empezaba en 0,3 km/h con incrementos progresivos de la misma cantidad cada 3 minutos, durante una hora al día.

Yoshinari *et al.* (2005), analizaron diferentes respuestas terapéuticas que el ejercicio en *treadmill* puede tener en el fallo cardíaco debido a isquemia o infarto. Varias ratas fueron sometidas a un programa corto (5') o largo (15') de carrera durante 12 semanas a una velocidad de 28 m/min luego de provocárseles una estenosis en su arteria coronaria.

Lloyd *et al.* (2005), examinaron el efecto del VEGF (*Vascular Endothelial Growing Factor*) como mediador de la angiogénesis y arteriogénesis en respuesta al entrenamiento físico de músculo isquémico. Para ello hicieron correr ratas durante 14 días a doble sesión por día a una velocidad tal que pudieran hacerlo de forma continua sin llegar a la fatiga durante una hora. El rango de velocidad estaba entre 15 - 20 m/min y el grado de inclinación del tapiz fue del 15 %.

McAllister *et al.* (2005), analizaron el papel del entrenamiento

de resistencia sobre la vasodilatación a nivel endotelial del músculo esquelético. Las ratas corrieron de 8 a 12 semanas en un tapiz rodante a una velocidad progresiva (hasta 30 m/min) con el fin de que logaran hacerlo de forma continua durante 60 minutos por día y a una inclinación del 10 %.

Seo *et al.* (2006), estudiaron el efecto del entrenamiento sobre *treadmill* de la regeneración axonal en la lesión del nervio ciático de ratas, las cuales estuvieron durante 3, 7 ó 14 días corriendo a dos sesiones de 30 minutos cada una en una plataforma horizontal a una velocidad de 18 m/min.

1.2.1.2. Protocolos en perros:

Tipton *et al.* (1974), para evaluar los efectos del entrenamiento, desentrenamiento y confinamiento en perros, realizaron una caracterización y estandarización de un protocolo en *treadmill* que podría ser usado en posteriores investigaciones. El protocolo consistió en 7 series de 3 minutos, con velocidades que iban desde 4,8 km/h hasta 6,4 km/h, con inclinaciones hasta del 20 % (con incrementos de 4%). El programa de entrenamiento fue de 8 a 10 semanas durante 5 días/semana y con aumentos progresivos en la

duración, intensidad y grado de la cinta hasta que alcanzaran en la última semana 75 minutos de carrera. Barron *et al.* (1997), posteriormente usaron el mismo protocolo para demostrar que los niveles de catecolamina y encefalina en el corazón disminuyen como consecuencia del ejercicio físico crónico.

Rogers *et al.* (1991), diseñaron un estudio, en el que determinaron los efectos del entrenamiento físico sobre la respuesta *in vitro* a la estimulación adrenérgica y peptidérgica de la arteria coronaria circunfleja. Para ello hicieron correr sobre una cinta rodante a 7 perros durante 11 semanas, 5 días/semana y 70 minutos cada día. El entrenamiento consistió en un calentamiento previo de 5 minutos, seguido de 20 - 25 minutos de velocidad hasta un máximo de 11,2 km/h al 10 % de inclinación del *treadmill* en la 9ª semana y 35 - 40 minutos de resistencia hasta 11,2 km/h al 20 %, disminuyendo cuando fuera necesario hasta 6,4 km/h.

Wang *et al.* (1993), con el fin de comprobar la hipótesis de que el ejercicio crónico aumenta la relajación mediada por el endotelio en la arteria coronaria circunfleja, entrenaron a 9 perros durante una semana a una velocidad de 10,9 Km/h, 1 hora por la mañana y otra hora por la tarde.

O'leary *et al.* (1997), analizaron la actividad simpática y parasimpática cardíaca durante ejercicio dinámico moderado e intenso y para ello entrenaron 7 perros a cuatro velocidades diferentes desde 3,2 km/h (0 % de inclinación) hasta los 8 Km/h (15% de inclinación), durante 3 - 5 minutos, cuando sus variables alcanzaran un estado estable.

Buckwalter y Clifford (1999), plantearon diferentes intensidades de trabajo en días separados, a 4,8 km/h (0% de inclinación), luego a 9,7 km/h (0% de inclinación) y finalmente a 9,7 km/h (10 % de inclinación) con el fin de examinar la existencia de una vasoconstricción mediada por receptores α -adrenérgicos en músculo esquelético activo durante ejercicio dinámico.

Hamann *et al.* (2002), utilizaron una única intensidad de 9,7 km/h durante 2 minutos con el objetivo de examinar la influencia de la vasoconstricción mediada por el simpático en la respuesta hiperémica en el inicio de un ejercicio dinámico.

Setty *et al.* (2004), para comprobar que la vasoconstricción coronaria mediada por un α -adrenoreceptor está incrementada en el miocardio durante ejercicio en la diabetes mellitus, ejercitaron 13

perros con 3 velocidades de entrenamiento de baja intensidad: Empezaron con 3,2 Km/h (0% de inclinación), continuaron con 4,8 Km/h (5%) y finalizaron a 6,4 Km/h (10% de inclinación) y con un tiempo en cada serie de 2 minutos (suficiente para alcanzar una constancia de las variables hemodinámicas).

1.2.1.3. Protocolos en cerdos:

Oltman *et al.* (1992), con el fin de determinar si el ejercicio físico induce cambios adaptativos en el control del tono vascular de arterias coronarias y Oltman *et al.* (1995), con el fin de probar que el ejercicio físico induce aumentos en la vasodilatación mediada por el endotelio de arteria coronaria, entrenaron cerdos, a los que se les aplicó un protocolo que inició con 3 mph (millas por hora) durante 20 - 30 minutos, seguidos de 15 minutos a una velocidad de 5 mph (a 0% de inclinación), graduando la velocidad y duración de las sesiones hasta que pudieran correr de forma continua durante 85 minutos en la semana 12, y a partir de la cual el entrenamiento se dividió de la siguiente manera: Un calentamiento de 5 minutos a 2,5 mph, seguido de una carrera de velocidad durante 15 minutos a 6 - 8 mph y una carrera de resistencia de 60 minutos a 4 - 6 mph y 5 minutos finales de enfriamiento a 2,0 mph. Barron *et al.* (1997),

también utilizaron este protocolo para demostrar que los niveles de catecolamina y encefalina en el corazón disminuyen como consecuencia del ejercicio físico crónico.

Muller *et al.* (1993) con el propósito de demostrar que la respuesta miogénica en la resistencia arterial coronaria está atenuada por el ejercicio físico y Muller *et al.* (1994) con el objeto de probar que la respuesta vasodilatadora de la resistencia arterial coronaria está incrementada como respuesta al ejercicio físico siguieron el mismo protocolo planteado por Oltman *et al.* (1992). Fogarty *et al.* (2004) más recientemente, también lo usaron para demostrar que el entrenamiento físico a largo plazo aumenta la vasodilatación mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular, vía óxido nítrico, en las arteriolas coronarias.

Laughlin *et al.* (2003), para determinar los efectos del género y del entrenamiento físico en la óxido nítrico sintasa (eNOS) y en la superóxido dismutasa (SOD) en arterias de músculo esquelético, entrenaron cerdos de ambos géneros durante 13 - 21 semanas, 5 días/semana en las que la velocidad y duración aumentaban progresivamente en las primeras 8 - 12 semanas y a partir de la cuales el trabajo era de 85 minutos, estructurado de la siguiente

forma: 1) Calentamiento, 5 minutos a 2,5 mph 2) Carrera de velocidad de 15 minutos a 5 - 8 mph 3) Carrera de resistencia de 60 minutos a 4 - 5 mph 4) Enfriamiento, 5 minutos a 2,0 mph. Se determinó la eficacia del entrenamiento por medio de una prueba de esfuerzo, de la capacidad oxidativa del músculo y de la relación entre el peso corporal y el peso del corazón.

Rush *et al.* (2003), sometieron a varias cerdas a un régimen de entrenamiento aeróbico moderado, con el propósito de estudiar si el ejercicio físico incrementa los niveles de óxido nítrico sintasa (eNOS) y si reduce el estrés oxidativo basal en endotelio aórtico. Empezaron corriendo a 3 mph, de 20 a 30 minutos, seguidos de 15 minutos a una velocidad de 5 mph (a 0% de inclinación), graduando la velocidad y duración de las sesiones hasta que pudieran correr de forma continua durante 85 minutos en la semana 12 y a partir de ahí el entrenamiento consistió en un calentamiento de 5 minutos a 2,5 mph, seguido de carreras de velocidad de 15 minutos a 6 - 8 mph y carreras de resistencia durante 60 minutos a 4 - 6 mph y 5 minutos finales de enfriamiento a 2,0 mph. El protocolo se realizó durante 16 - 19 semanas a razón de 5 días/semana.

Siguiendo los protocolos de Laughlin *et al.* (2003) y realizando

al final una prueba de esfuerzo para determinar la capacidad de trabajo y calcular la eficacia del entrenamiento, Woodman y su grupo de investigación sometieron a entrenamiento sobre cinta rodante a cerdos durante 16 semanas, 90 minutos por día, para realizar investigaciones con las siguientes finalidades: Investigar si el entrenamiento físico de resistencia atenúa los efectos de la hiperlipidemia en la función endotelial por el incremento de la vasorrelajación mediada por óxido nítrico en arteria braquial (Woodman *et al.*, 2003); comprobar si el entrenamiento físico de la resistencia atenúa los efectos de la hipercolesterolemia en la función endotelial de arteria coronaria (Woodman *et al.*, 2004); demostrar si el género de los cerdos no afecta en los procesos adaptativos del entrenamiento físico de la resistencia sobre los animales hipercolesterolémicos (Woodman *et al.*, 2005); y determinar si el entrenamiento físico de resistencia aumenta la dilatación dependiente de endotelio y mejora el flujo sanguíneo en la arterial femoral de animales hipercolesterolémicos (Woodman *et al.*, 2006).

Henderson *et al.* (2004), para probar que el entrenamiento físico mejora la función endotelial de las arteriolas coronarias en estados tempranos de enfermedad cardiovascular en cerdos

alimentados con dieta alta en grasa y colesterol, fueron entrenados con un protocolo progresivo de carrera en *treadmill* durante 16 semanas, 5 días/semana y consistió en 5 minutos de calentamiento a 2,5 mph; 15 minutos de carrera de velocidad a 5 - 8 mph; 60 minutos de carrera de resistencia a 4 - 5 mph y finalmente 5 minutos de enfriamiento a 2,5 mph. La eficacia del entrenamiento fue determinada a partir de la duración del ejercicio y de la frecuencia cardiaca.

Korzick *et al.* (2004), buscando determinar si la modulación del marcaje intracelular de Ca^{++} por la proteín-quinasa C, sustenta la contracción miogénica aumentada en el ejercicio y en la enfermedad cardiaca coronaria y Korzick *et al.* (2005), con la intención de establecer si el perfil isomorfo de la protein-quinasa C está alterado en la enfermedad cardiaca crónica y si el ejercicio puede prevenir esos cambios, entrenaron a 7 cerdos machos a un 75 % del consumo máximo de oxígeno durante 16 semanas, 85 minutos al día, con un calentamiento de 5 minutos a 2,5 mph, seguido de carreras de velocidad durante 15 minutos a 5 - 8 mph y carreras de resistencia en un periodo de 60 minutos a 4 - 5 mph y 5 minutos finales de enfriamiento a 2,0 mph.

Korte *et al.* (2005), entrenaron 12 cerdos durante 14 semanas, 4 días/semana, con el fin de evaluar si la dislipemia diabética puede causar algún daño en la función miocárdica y si el entrenamiento físico de resistencia atenuaría esos cambios. Durante las 2 semanas de familiarización la intensidad fue variada hasta alcanzar un valor de frecuencia cardiaca correspondiente al 65 - 75 % de la máxima. Posteriormente el entrenamiento se realizó con un calentamiento de 10 minutos, después, 30 minutos a la frecuencia deseada y 5 minutos finales de enfriamiento. La eficacia del entrenamiento fue determinada a partir de la frecuencia cardiaca en reposo.

1.2.1.4. Protocolos en conejos:

Jover *et al.* (1987), con el objetivo de definir el consumo máximo de oxígeno de conejos en *treadmill*, la concentración de lactato en plasma y el índice de deuda de oxígeno, seleccionaron por su buena capacidad para correr a cuatro conejos de una variedad cruzada inglesa. Cada conejo corrió a 8, 12, 16 y 20 m/min a intervalos de 3 - 4 días, durante 4 minutos o hasta alcanzar la fatiga.

DiCarlo y Bishop (1988), usaron conejos de la raza *New Zealand White* (NZW), a los que ejercitaron durante 8 semanas en un programa de entrenamiento de resistencia en *treadmill*, con el propósito de examinar los efectos del entrenamiento físico de resistencia sobre el control barorreflejo de la frecuencia cardiaca y la actividad simpática renal, En la primera semana corrieron a una velocidad de 7,2 m/min, 15 minutos, en la segunda lo hicieron de la misma forma adicionando 5 minutos de carrera a 12,6 m/min, y en las semanas subsiguientes el tiempo fue incrementado, hasta alcanzar los 60 minutos de carrera en la velocidad más alta alrededor de la última semana. Más adelante los mismos autores (1990), utilizaron el mismo protocolo con el fin de demostrar que el entrenamiento físico refuerza la inhibición cardiopulmonar del estímulo barorreflejo arterial en conejos NZW. Gonzales *et al.* (2005), posteriormente usaron este protocolo con el fin de evaluar si la intervención alimentaria y el ejercicio pueden mejorar la sensibilidad a la insulina y disminuir el desarrollo de la aterosclerosis en la que usaron conejos NZW y la variedad Watanabe.

O'Hagan *et al.* (1993), seleccionaron por su disposición para correr en el *treadmill*, conejos NZW de ambos sexos, que realizaron

dos protocolos de ejercicio a diferentes intensidades. El primero de ellos, a un 92 % de la capacidad aeróbica máxima, consistió en una carrera durante 2 minutos a 12 m/min; y el segundo, a un 84 % de su capacidad máxima aeróbica, fue de 5 minutos de carrera a una velocidad de 7 m/min. Entre cada uno hubo 30 minutos de descanso y su orden de ejecución era alterno. Todo esto con el objetivo de analizar si el incremento en la actividad nerviosa simpática renal durante ejercicio en cinta rodante era debido a la intensidad de la carga. Mueller *et al.* (1998), con el fin de determinar el papel de la inervación renal en el control del flujo sanguíneo hacia el riñón durante ejercicio dinámico, utilizaron los dos mismos protocolos anteriores, con un descanso entre cada uno de 45 minutos y agregando un tercero que consistió en una carrera de 15 m/min con una inclinación de la cinta del 17 % hasta la fatiga.

Chen y Li (1993), evaluaron los efectos del entrenamiento físico en la vasodilatación dependiente de endotelio, utilizando conejos machos NZW, los que fueron asignados aleatoriamente para realizar un protocolo de ejercicio en cinta rodante durante 8 semanas, 5 días/semana, con una semana previa de familiarización. En la primera semana la sesión fue de 0,88 km/h durante 10 minutos y en las posteriores el tiempo se incrementó en

5 - 10 minutos por semana hasta alcanzar los 60 minutos por día. Esto correspondió aproximadamente al 70 % de su capacidad máxima de trabajo, la cual fue estimada a partir de la frecuencia cardiaca. El mismo protocolo fue usado posteriormente por Jen *et al.* (2002), con el fin de evaluar los efectos del ejercicio crónico en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, en machos NZW con aterosclerosis y por Yang y Chen (2003), que analizaron los efectos del ejercicio físico en la distribución de moléculas adherentes y de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Yang *et al.* (2003), hicieron una pequeña modificación, disminuyendo el tiempo por día a 30 - 40 minutos y durante 2, 4 ó 6 semanas, para estimar la evolución en el tiempo de la disfunción vascular en aorta de conejos y el grado de mejora de algunos de sus parámetros con la ejecución de un protocolo de entrenamiento físico.

Hexeberg *et al.* (1995), estudiaron los efectos del entrenamiento físico de resistencia en el rendimiento miocárdico local en condiciones de reposo. Para ello, aplicaron a un grupo de conejos un programa de entrenamiento en *treadmill* de 10 semanas de duración, durante 5 días a la semana, con incrementos graduales de la velocidad de 0,5 - 1,2 km/h desde 15 a 60 minutos.

Carroll y Kyser (2002), investigaron los efectos del entrenamiento físico sobre la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca en reposo, la hipertrofia muscular, el volumen sanguíneo y el perfil hormonal en conejas NZW obesas y/o entrenadas. Tras una semana de familiarización las sometieron aleatoriamente a un protocolo de ejercicio progresivo en *treadmill* durante 12 semanas a razón de 5 días/semana. Utilizaron como medida de la capacidad de trabajo, el Kilopondio por metro (kpm), el cual variaron semanalmente de la siguiente forma: Semana 1, 70 kpm; semana 2, 120; semana 3, 160; semana 4, 220; semana 5, 260; semana 6, 320; semana 7, 370; semana 8, 420; semana 9, 470; semana 10 - 12, 520. Los animales obesos y los controles corrieron entre 16,1 - 21,4 m/min y si la duración de la sesión superó los 30 minutos, se dividió en dos series por día, con un descanso no inferior a una hora. La primera semana fue de 7 - 8 minutos de carrera y progresivamente se aumentó hasta los 50 - 60 minutos en la semana 10. Un protocolo similar fue usado posteriormente por Carroll (2003), para estudiar los efectos del ejercicio físico sobre la estimulación β -adrenérgica disminuida en conejas NZW obesas. Carroll *et al.* (2005), modificaron la inclinación del tapiz en un 2,5 % y las intensidades de trabajo de la siguiente forma: Semana 1, 160; semana 2, 230; semana 3, 290; semana 4, 350; semana 5, 410;

semana 6, 460; semana 7, 500; semana 8 - 12, 530; con el fin de comparar dos programas de entrenamiento físico sobre la respuesta cardiaca a la estimulación β -adrenérgica en corazones de conejas NZW obesas.

Zsabo *et al.* (2003), aplicaron un protocolo de ejercicio en *treadmill* a un grupo de conejos de la variedad *Pannon White*, con el fin de observar los cambios metabólicos inducidos por el ejercicio regular aeróbico submáximo durante 4 semanas dos veces al día, a una velocidad de 3 - 9 m/s, 1'2 - 1'6 km/día.

Pliquett *et al.* (2003), calcularon la función refleja cardiopulmonar, en conejos con fallo cardíaco crónico sometidos a un entrenamiento de corta duración y evaluaron el efecto de éste sobre la actividad simpática en reposo. Para ello, escogieron conejos machos NZW, a los que sometieron a un protocolo de ejercicio de 3 semanas en *treadmill*, durante 6 días cada semana. Les realizaron un calentamiento previo de 5 minutos a 4 m/min, luego fueron ejercitados durante 30 minutos a una velocidad de 18 - 20 m/min y finalmente una vuelta al reposo de 5 minutos a 4 m/min.

Becker *et al.* (2004), realizaron un protocolo de entrenamiento

en machos NZW de 8 semanas de trabajo, durante 5 días a la semana, 30 minutos cada sesión. Se aplicaron cinco intervalos de ejercicio continuo: 1) Calentamiento, 4 minutos a una velocidad de 11 m/min 2) 6 minutos a 16 m/min; 3) 10 minutos a 27 m/min; 4) 6 minutos a 16 m/min; y 5) 4 minutos a una velocidad de 11 m/min como enfriamiento. El objetivo de este estudio fue mostrar los efectos del entrenamiento de resistencia en la actividad y estructura del intercambiador Ca^{2+} del túbulo transverso y del retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético en reposo.

De Moraes *et al.* (2004), con el fin de analizar los efectos del entrenamiento físico en la reactividad vascular del riñón, sometieron durante 12 semanas a conejos NZW de ambos sexos a un protocolo en cinta rodante, seleccionados aleatoriamente después de una semana de adaptación al entrenamiento aeróbico en la cual la velocidad y el tiempo iban aumentando progresivamente a partir de los 12 m/min y 10 minutos. Dicho protocolo consistió en una carrera durante 60 minutos a una velocidad de 18 m/min. La eficacia del entrenamiento se midió a través de una prueba maximal de carrera en el *treadmill*.

Liu *et al.* (2000), plantearon un protocolo diferente a la cinta

rodante. Diseñaron una rueda motorizada para ejercitar conejos, utilizando machos NZW previamente aclimatados en el dispositivo, que fueron entrenados 40 minutos al día, 6 días a la semana, durante 4 semanas. El protocolo empezó con un calentamiento de 5 minutos a una velocidad de 5 m/min, seguido de un pico de 15 - 18 m/min durante 30 minutos y terminó con un enfriamiento de 5 minutos a 5 m/min. El objetivo del estudio fue determinar los efectos del ejercicio sobre la actividad nerviosa simpática y sobre la función barorrefleja en el fallo cardiaco. Posteriormente, en otro estudio, Liu *et al.* (2002), utilizaron nuevamente el mismo protocolo en una población con la mismas características que la anterior, con el fin de determinar los cambios a nivel simpático y vagal del corazón en fallo cardíaco crónico después de un programa de ejercicio.

1.2.2. Parámetros de entrenamiento usados.

1.2.2.1. Citrato sintasa.

Diversos autores han usado como parámetro de entrenamiento el análisis de la actividad de la enzima citrato sintasa, según el procedimiento de Srere (1971) De entre los investigadores que analizaron dicha enzima cabe citar a Muller *et al.* (1993, 1994);

Oltman *et al.* (1995); Barron *et al.* (1997); Laughlin *et al.* (2003); Henderson *et al.* (2004); Fogarty *et al.* (2004); Korzick *et al.* (2004, 2005), quienes la estudiaron en el tríceps braquial de cerdos, mientras que otros autores, la determinaron a partir del músculo deltoides de cerdos (Woodman *et al.*, 2003, 2004, 2005, 2006; Rush *et al.*, 2003; Laughlin *et al.* 2003 y Fogarty *et al.* 2004).

Otros autores analizaron la actividad de éste parámetro en el músculo sóleo la rata (Spier *et al.* 1999 y McAllister *et al.* 2005), y vasto lateral de ratas (McAllister *et al.* 2005).

Powers *et al.* (1995), y Demirel *et al.* (1998), la utilizaron como índice del incremento de la capacidad oxidativa en el músculo plantar de rata.

Jen *et al.* (2002), Yang y Chen (2003) y Yang *et al.* (2003) teniendo como consideración que el cálculo de este parámetro está generalmente aceptado como método bioquímico para confirmar la eficacia del entrenamiento físico, lo midieron a partir de una muestra del músculo sóleo de los conejos y expresaron que su protocolo de entrenamiento realmente fue efectivo.

Carroll y Braden (1999), con el fin de determinar el papel del ejercicio físico en la estructura cardíaca de conejos obesos, caracterizó la actividad de la citrato sintasa en músculo sóleo y gastrocnemio para calcular la efectividad del protocolo de entrenamiento. Posteriormente fue tenido como parámetro en sus posteriores trabajos y los de su equipo: Carroll y Kyser (2002), Carroll, (2003) y Carroll *et al.* (2005).

1.2.2.2. Capacidad de trabajo físico.

Muller *et al.* (1993, 1994); Oltman *et al.* (1995); Laughlin *et al.* (2003) Henderson *et al.* (2004); Woodman *et al.* (2003, 2004, 2005, 2006) y Korzick *et al.* (2004, 2005), realizaron en cerdos una prueba de esfuerzo en *treadmill* al principio y al final del entrenamiento para evaluar la tolerancia al ejercicio.

Wisloff *et al.* (2001), antes y después del entrenamiento de ratas, realizaron sendas pruebas para determinar la eficacia del protocolo de entrenamiento.

Lloyd *et al.* (2005), consideraron el tiempo en aparecer la fatiga como una variable para dosificar la intensidad del entrenamiento en

ratas.

Martins *et al.* (2005), utilizaron este parámetro para determinar la capacidad de ejercicio máximo en ratas, y aplicar las respectivas intensidades y comparar la eficacia del entrenamiento en diferentes semanas.

Jover *et al.* (1987), con el fin de evaluar en conejos las respuestas metabólicas y hemodinámicas del ejercicio próximo al máximo en un *treadmill*, consideraron la aparición de la fatiga (síntomas y signos de la misma) como un criterio de esfuerzo.

De Moraes *et al.* (2004), con el objetivo de observar las modificaciones que produce el entrenamiento físico sobre la reactividad muscular en la circulación renal enteral, aplicaron como criterio de efectividad del entrenamiento una prueba maximal de rendimiento, hasta el agotamiento, en cinta rodante.

1.2.2.3. Consumo máximo de oxígeno.

Bedford y Tipton (1987), determinaron las intensidades del entrenamiento en ratas a partir del consumo máximo de oxígeno,

siendo este alcanzado si el incremento del $\text{VO}_2\text{máx}$ era del 5 % o menos.

Powers *et al.* (1998) y Demirel *et al.* (1998), trabajaron a una intensidad relativa del 75 - 80 % del $\text{VO}_2\text{máx}$ en ratas.

Wisloff *et al.* (2001), usaron el $\text{VO}_2\text{máx}$ como variable para el control de la intensidad del entrenamiento en ratas.

Rush *et al.* (2003), hace referencia a sus trabajos previos en los que han determinado esta variable en cerdos y la han tenido en consideración para dosificar las intensidades de entrenamiento.

1.2.2.4. Frecuencia cardiaca.

Tipton *et al.* (1974), midieron la frecuencia cardiaca en perros, antes, durante y después de la prueba de esfuerzo y la utilizaron para evaluar la condición de entrenado, no entrenado y desentrenado a través de una prueba con atropina.

Rogers *et al.* (1991), realizaron dos pruebas submaximales en perros para observar la respuesta de la frecuencia cardiaca al

ejercicio.

Barron *et al.* (1997), utilizaron el descenso de la frecuencia cardiaca como patrón para evaluar la eficacia del entrenamiento en cerdos y perros.

Muller *et al.* (1993, 1994); Oltman *et al.* (1995); Laughlin *et al.* (2003); Henderson *et al.* (2004); Woodman *et al.* (2003, 2004); Korzick *et al.* (2004, 2005), durante la prueba de esfuerzo tomaron la frecuencia cardiaca en cerdos.

Wisloff *et al.* (2001), determinaron la frecuencia cardiaca máxima como el valor más alto alcanzado durante una carrera supramaximal, realizada luego de la prueba del $\text{VO}_2\text{máx}$ en ratas.

Chen y Li (1993), estimaron la intensidad de trabajo (70 % de la capacidad de trabajo máxima) a partir de la frecuencia cardiaca, con el fin de evaluar los efectos del ejercicio físico aeróbico en la vasorrelajación dependiente del endotelio en conejos y posteriormente Jen *et al.* (2002), Yang y Chen (2003) y Yang *et al.* (2003), utilizaron el mismo protocolo para observar los efectos del ejercicio crónico en la respuesta vasodilatadora dependiente del

endotelio en conejos hipercolesterolémicos, conejos ateroscleróticos y en la función vascular aórtica, respectivamente.

1.2.2.5. Lactato en plasma

O'Hagan *et al.* (1993), con el fin de observar en conejos el efecto del ejercicio dinámico en la actividad simpática renal y Mueller *et al.* (1998), en las respuestas hemodinámicas renales, utilizaron el nivel de lactato en plasma (concentración menor de 4 mM) en la intensidad de trabajo correspondiente al 84 % de la capacidad aeróbica previamente estimada por Jover *et al.* (1987).

1.2.2.6. Índice de peso corporal / peso del corazón.

Muller *et al.* (1993, 1994); Oltman *et al.* (1995); Henderson *et al.* (2004); Rush *et al.* (2003); Laughlin *et al.* (2003); Fogarty *et al.* (2004); Woodman *et al.* (2003, 2004) y Korzick *et al.* (2004, 2005) utilizaron esta relación como una variable más para determinar la eficacia del entrenamiento en cerdos.

Powers *et al.* (1998) y Demirel *et al.* (1998), utilizan la

hipertrofia cardiaca como uno de los criterios que se utilizó en previos estudios del grupo para determinar la intensidad óptima de entrenamiento en ratas.

1.2.2.7. Temperatura rectal.

Di Carlo *et al.* (1988, 1990), con la intención de examinar los efectos del entrenamiento de resistencia sobre el control barorreflejo de la frecuencia cardiaca y de la actividad nerviosa simpática renal en conejos, utilizaron la temperatura rectal para determinar la intensidad del ejercicio, considerando un incremento de 2,5 °C como una intensidad de entrenamiento adecuada.

1.2.2.8. Superóxido dismutasa.

Powers *et al.* (1995), hacen referencia a trabajos previos de su equipo, en el que se ha demostrado aumentos de esta variable como consecuencia del entrenamiento en ratas y la consideran como un parámetro de entrenamiento.

1.2.3. Estudio especial de los protocolos de entrenamiento usados por nuestro grupo de investigación.

Nuestro equipo de investigación ha venido trabajando con dos protocolos. Así, Such *et al.* (2002), con el objetivo de estudiar las modificaciones intrínsecas en el automatismo, conducción y refractariedad del miocardio producidas por el ejercicio crónico, entrenaron conejos NZW, previa familiarización de 4 días en *treadmill*. Se realizó durante 6 semanas, 5 días/semana a una velocidad de 30 m/min en 6 series de 4 minutos cada una con un minuto de descanso entre series. En la actualidad estamos trabajando con un protocolo de baja intensidad, que consiste en la realización de 6 series de 4 minutos, con un minuto de descanso entre ellas y cuya velocidad durante las 6 semanas de entrenamiento es de 20 m/min.

1.2.4. Hipótesis de trabajo.

Nuestra hipótesis se basa en que la realización de ejercicio físico crónico usando el protocolo de menor intensidad de los usados por nuestro grupo investigador, previamente descrito en el correspondiente apartado, debe modificar los parámetros de

entrenamiento usados por nosotros y por diferentes autores, y que son:

- Electrofisiológicos (frecuencia cardíaca *in vivo* e *in vitro*).
- Bioquímicos (lactato en sangre venosa, expresión de la enzima óxido nítrico sintasa y de la proteína de choque térmico).

Esperamos que el protocolo de entrenamiento usado por nosotros reduzca la frecuencia cardíaca *in vivo* en reposo y tras extraer y aislar el corazón (*in vitro*).

Por otra parte esperamos que, en los animales sometidos a entrenamiento, la concentración sanguínea venosa de lactato experimente modificaciones que indiquen la posible adaptación cardiovascular-metabólica propia de aquellas que propician una participación progresivamente mayor de los procesos aeróbicos.

Finalmente pensamos que la aplicación del protocolo producirá en el miocardio ventricular de los animales entrenados una mayor expresión de la óxido nítrico sintasa y de las proteínas de choque térmico, que en el miocardio ventricular de los animales control.

1.2.5. Plan de trabajo.

Para intentar llegar a los objetivos planteados, realizaremos el siguiente plan de trabajo:

1. Entrenaremos a conejos en tapiz rodante, siguiendo nuestro protocolo.
2. Mantendremos estabulados, sin realizar ejercicio, otro grupo de conejos.
3. Durante el período de entrenamiento y/o estabulación realizaremos la toma de muestras de lactato en algunas sesiones de carrera sobre la cinta rodante.
4. Tras el periodo de entrenamiento y/o estabulación, procederemos a aislar los corazones de ambos grupos de conejos.
5. Realizaremos el estudio de los parámetros electrofisiológicos y bioquímicos a analizar.

6. Finalmente, procederemos a comparar entre ambos grupos los resultados obtenidos, y extraeremos las correspondientes conclusiones.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL.

2.1.1. Animales de experimentación: Características.

Se efectuó el estudio en 22 conejos machos de raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), de peso medio previo al inicio del protocolo de entrenamiento y/o estabulación de $2'5 \pm 0'4$ Kg, alimentados *ad libitum*. Los animales fueron suministrados por el departamento de Fisiogenética de la Universidad Politécnica de Valencia.

2.1.2. Reactivos.

- Solución de Tyrode: Compuesto por CaCl_2 , MgCl_2 , ClK, NaH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl y glucosa de Panreac[®] Química S.A.
- Ketamina (Ketolar[®] Parke-Davis).
- Heparina sódica al 5% (Rovi[®]).
- Tiras reactivas BM-Lactate (Accutrend[®]Lactate) de Roche
- Povidona Iodada al 10% (Betamadrileño, S.L.)
- Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
- Anticuerpos StressGen Biotechnologies Corp.

- Kit de revelado *Protolot Western Blot AP System*, Promega®

2.1.3. Aparatos.

- Balanza de precisión (Precisa Balances®) y balanza Soehnle®.
- Tapiz rodante (“treadmill”) Panlab® S.L.
- Analizador de tiras para la determinación de lactato (Accutrend® Lactate) de Roche.
- Cubetas de electroforesis Mini-PROTEAN 3Cell, BIORAD®.
- Cubetas de electrotransferencia Mini Trans-Blot Cell., BIORAD®.
- Centrífugas: GLC-1 (de baja velocidad), SORVALL® y Sepatech Biofuge 17RS (de alta velocidad), HERAEUS®.
- Espectrofotómetro termostático Uvikon 810., KONTRON®
- Fuentes de alimentación para la electroforesis: PS 250-2, SIGMA®, y 200/2.0 PowerSupply, BIORAD®.
- Densitómetro de escaneo BioRad (BioRad, Hercules, CA)

- Polígrafo GRASS[®], *Model 7 Poligraph* (Grass Instruments CO., Quincy, Mass., USA)
- Electrodo bipolar de registro.
- Electrodo múltiple
- Ordenador PC
- Programas informáticos PaceMap[®], Biopac[®], SPSS[®], Microsoft[®] Office[®] 2003.
- Sistema de cartografía Maptech[®] (Waalre, Holanda)
- Sistema de soporte metabólico tipo Langendorff (fig. 2.1.)

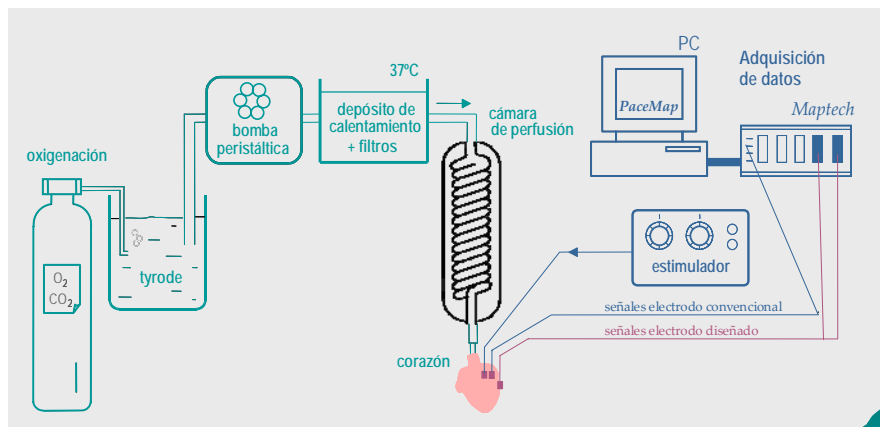


Fig. 2.1. Esquema de un montaje tipo Langendorff para corazón aislado.

- Bomba peristáltica (Cole-Parmer[®] Instrument Co.)
- Bomba circulante para baño de termostatación (Neslab[®] Instrument, inc.)

2.2. MÉTODOS.

2.2.1. Protocolo de entrenamiento.

Cada conejo estuvo en una jaula individual de dimensiones reglamentarias, en las que permanecieron para su estabulación durante 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura de 21 - 23°C y humedad relativa del 31%.

Los conejos fueron entrenados en cinta rodante durante 6 semanas. El protocolo de entrenamiento consistió en 30 sesiones (5 días a la semana). Cada sesión se compuso a su vez de 6 series, en cada una de las cuales el animal corrió a una velocidad de 20 m/min, durante 4 minutos. El intervalo de descanso entre las series fue de un minuto. Previamente a la iniciación de las sesiones de entrenamiento, los conejos fueron sometidos a un período de 4 sesiones de familiarización con la cinta rodante. (fig. 2.2.)



Fig. 2.2. Animal dentro de la jaula con cinta rodante.

La correcta realización del ejercicio sobre la cinta rodante fue regularmente supervisada por dos observadores. Los conejos que una vez iniciado el período de entrenamiento no corrieron adecuadamente durante cinco sesiones consecutivas, fueron excluidos del presente estudio. Finalizado el protocolo de entrenamiento se procedió a sacrificar a los animales para realizar el estudio electrofisiológico.

Los conejos no entrenados (grupo control) permanecieron en las respectivas jaulas durante el mismo tiempo total del entrenamiento, esto es, seis semanas, más la semana que entraña la familiarización de los conejos con la cinta para su posterior entrenamiento.

2.2.2. Preparación experimental del estudio electrofisiológico.

Tras la heparinización (heparina 800 u.i.), y anestesia intravenosa de los conejos (ketamina 12'5 mg/kg), a través de la vena marginal de la oreja (fig. 2.3.), se sacrificaron mediante contusión cervical. Después de una toracotomía mediosternal y una pericardiotomía, se extrajo el corazón rápidamente, seccionándolo por su pedículo vascular, y se sumergió en una solución fría de Tyrode (8° C), para su posterior manipulación. Tras seccionar la arteria pulmonar y a continuación disecar la arteria aorta ascendente, ésta se seccionó también, y se conectó a un sistema de Langendorff, donde se fijó mediante un hilo de seda de 1 - 2 mm de diámetro, perfundiendo retrógradamente al corazón con la solución de Tyrode a $37 \pm 0'5$ °C, y que contiene en concentración (expresado en mM): NaCl 130, KCl 4'7, CaCl₂ 2'2, MgCl₂ 0'6, NaH₂PO₄ 1'2, NaHCO₃ 24'2 y glucosa 12. El pH se mantuvo a 7'4 (García Civera R *et al.*, 1987; citado por Such LM, 2005). La oxigenación y soporte de pH de la solución de Tyrode se efectuó con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). La presión de perfusión inicial se fijó en 60 mmHg.

El sistema de perfusión de Langendorff, que hemos mostrado con anterioridad en la figura 2.1., permite la llegada al corazón del oxígeno y los nutrientes necesarios a través de la aorta ascendente. Se trata de una perfusión hacia el sistema de vasos coronarios.

Una vez ubicado el corazón en el sistema, se eliminaron los restos de los demás tejidos (pulmón, tráquea, etc.) y mediante una pequeña sección en la aurícula izquierda, se procedió a la realización de una pequeña apertura en la orejuela de la aurícula izquierda para poder cortar las cuerdas tendinosas de la válvula mitral, con el fin de hacerla insuficiente y permitir el escape, en su caso, de líquido por la aurícula izquierda, evitando así posibles acumulaciones de Tyrode en el ventrículo izquierdo, en caso de que la válvula aórtica mostrara cierta insuficiencia.

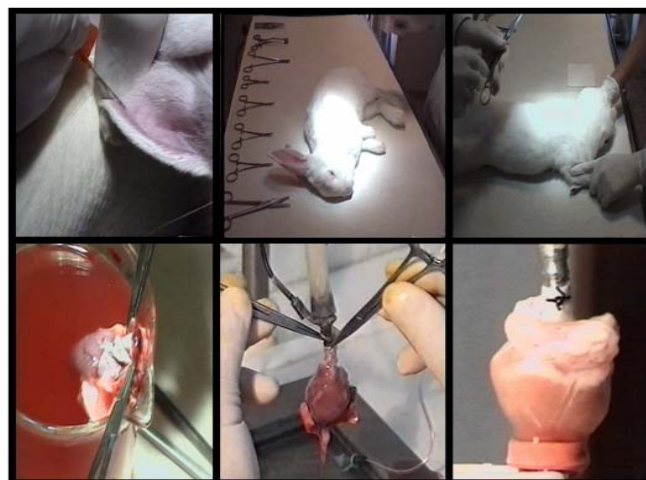


Fig. 2.3. Distintos momentos de la parte experimental.

El líquido de perfusión es impulsado desde un depósito exterior donde se oxigena hasta la parte más elevada del sistema de Langendorff por medio de una bomba peristáltica, previo paso por un filtro. Una vez en el sistema el líquido va calentándose progresivamente hasta alcanzar una temperatura de 37°C.

Los electrodos se dispusieron del siguiente modo. Se ubicó un electrodo bipolar, revestido de plata para el registro del electrograma auricular, y otro electrodo en el ventrículo izquierdo para la estimulación. El registro ventricular se realizó por medio de un electrodo múltiple con 256 electrodos unipolares de acero inoxidable colocados en la superficie epicárdica de la pared lateral del ventrículo izquierdo. El electrodo indiferente se ubicó sobre la aorta canulada. La grabación de los registros fue obtenida con un sistema de cartografía de la actividad eléctrica cardiaca (MapTech®).

2.2.3. Parámetros estudiados y determinación de los mismos.

2.2.2.1. Definición de los parámetros.

- Frecuencia cardiaca (*in vivo* e *in vitro*): Parámetro que está en relación inversa con la longitud del ciclo sinusal - la cual medimos directamente sobre el trazado electrocardiográfico- y que se utiliza para evaluar el automatismo sinusal.
- Expresión de la enzima óxido nítrico sintasa, iNOS) y de la proteína de choque térmico, HSP60: Son los niveles proteicos de los genes contenidos en un homogenado de tejido miocárdico.

2.2.2.2. Determinación de los parámetros.

- Frecuencia cardiaca *in vivo*:

Para la determinación de la frecuencia cardiaca *in situ* se utilizó un polígrafo de 8 canales con cuatro electrodos de aguja fijados a las extremidades del animal, lo que nos permitió el registro electrocardiográfico en papel, para la posterior medida de la distancia entre los complejos ventriculares.

Se realizaron dos registros electrocardiográficos. El primero que nos sirvió como valor basal, se llevó a cabo en la semana anterior al comienzo del protocolo de entrenamiento, es decir, en el periodo establecido para la familiarización del conejo con la cinta rodante. El segundo registro electrocardiográfico se realizó en la sexta y última semana de entrenamiento, y constituyó el valor final de dicho parámetro *in vivo*.

Tras la introducción de los conejos en el inmovilizador y colocación de los electrodos, la señal eléctrica se captó, registró y almacenó con el polígrafo GRASS[®] y el programa Biopac[®] para su posterior análisis.

- Frecuencia cardiaca *in vitro*:

Para averiguar la frecuencia cardiaca en el corazón aislado, se procedió a la medida de la longitud del ciclo sinusal (L.C.S.) basal, en milisegundos (ms) en el registro electrográfico, determinado desde la aplicación del programa informático PaceMap[®] (Fig. 2.4)



Fig. 2.4. Registro electrocardiográfico y medida del intervalo V-V.

- Concentración de lactato en sangre venosa:

Por punción en vena marginal del pabellón auditivo del conejo, se obtuvo la sangre venosa que fue depositada directamente sobre la tira reactiva que se introdujo en el aparato medidor correspondiente que finalmente dio la lectura del valor de la concentración.

Se realizaron tres muestras por sesión de entrenamiento:

Una, antes de empezar la sesión de carrera continua; otra, transcurrida la primera serie de la sesión de entrenamiento; y finalmente, una más tras la sexta serie de entrenamiento.

Los controles de lactato se realizaron en la primera sesión de entrenamiento de la primera semana del protocolo, en la primera sesión de la cuarta semana del protocolo de entrenamiento y finalmente en la última sesión de la sexta semana de

entrenamiento, con lo que pudimos conocer los niveles de lactato en sangre antes, durante y al final del proceso.

- Expresión de la enzima óxido nítrico sintasa, iNOS y de la proteína de choque térmico HSP60:

Obtuvimos seis biopsias de ventrículo izquierdo de conejo, tres de ellas de conejos del grupo entrenado y tres del grupo control. Éstas se adquirieron inmediatamente después de finalizar el protocolo experimental mediante la técnica del *freeze-clamping*, que consiste en la compresión de la muestra con unas pinzas que previamente han sido sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C). La muestra se sumergió en este líquido unos segundos, hasta su congelación, preservando así todas sus características bioquímicas, y se almacenaron a -85°C hasta su posterior análisis bioquímico.

Para el estudio de la expresión de la iNOS y la HSP60 miocárdica se realizó una electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) y posterior Western-Blotting (fig. 2.4.)

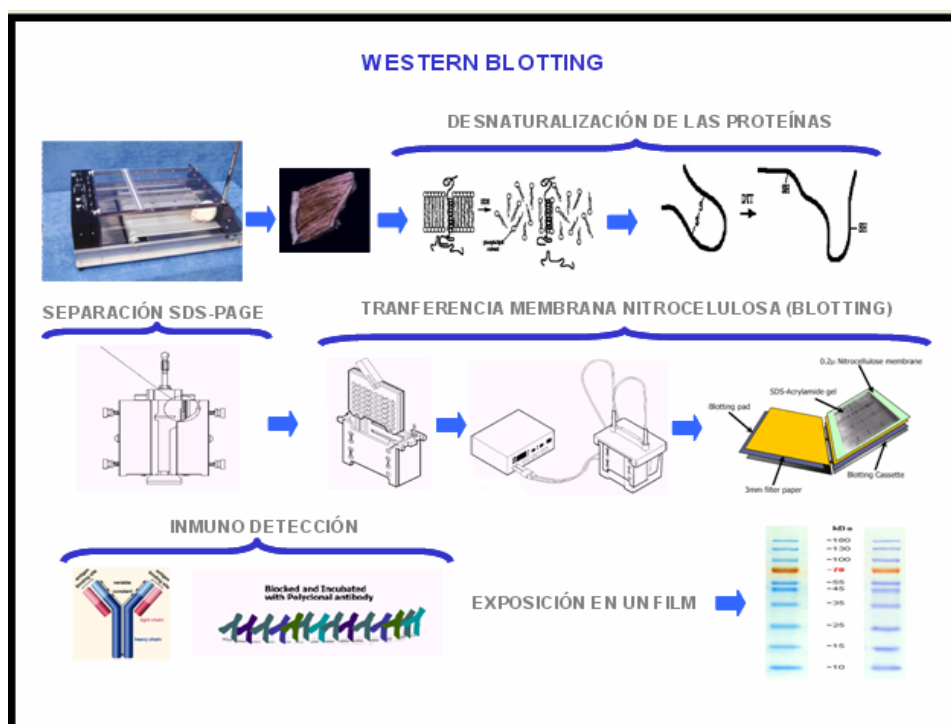


Fig. 2.4. Esquema de la técnica del *Western-Blotting* (tomado de Doménech E, 2006).

Mediante electroforesis, se procedió a la separación de alícuotas de tejido miocárdico lisado (150- 200 μ g). Posteriormente, fueron transferidas las proteínas a las membranas de nitrocelulosa (*Western-Blotting*), las cuales se incubaron durante una noche a 4°C de temperatura con agitación orbital en tampón de anticuerpos y en dilución con anticuerpos primarios apropiados: iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), HSP60 (StressGen Biotechnologies Corp.). Seguidamente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. Las proteínas específicas fueron visualizadas usando el procedimiento de la *Enhanced Chemiluminescence* (ECL),

especificado por el fabricante (Amersham Pharmacia, USA). Las señales autorradiográficas fueron calculadas utilizando un densitómetro de escaneo BioRad (BioRad, Hercules, CA). Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en función de los valores de expresión de α -actina (*Cell Signalling Technology*) en los extractos citosólicos musculares.

2.2.4. Grupos de estudio.

Se clasificó a los animales en dos grupos: Control, compuesto por un total de 10 conejos; y grupo Entrenado, compuesto por un total de 12 animales, a los que se les aplicó el protocolo de entrenamiento.

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

- 1) Para la comparación, entre los grupos entrenado y control, de la frecuencia cardiaca, se utilizó el test de la *t* de *Student* para muestras no apareadas de una cola.

- 2) Para comparar la concentración de lactato se usó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas en ambos factores.
- 3) Para comparar la expresión de la iNOS y la HSP60, se utilizó el test de U de Mann Withney.
- 4) Las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0'05$.
- 5) Para los análisis estadísticos se usaron el *software* SPSS[®], y el programa de Excel de Microsoft[®]

2.4. LEGISLACIÓN.

Todos los estudios fueron realizados de acuerdo con lo establecido en la Convención Europea de Estrasburgo, el 18 de marzo de 1986 (BOE 10 de febrero de 1990).

3. RESULTADOS

3.1. FRECUENCIA CARDIACA *IN VIVO*:

Una vez determinada la frecuencia cardiaca *in situ* después del período de entrenamiento de seis semanas, observamos una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de ésta variable (aumento en la longitud del ciclo sinusal), en los conejos entrenados respecto a los animales control. También, cabe destacar la disminución en la desviación estándar de la media en los conejos entrenados (Tabla 3.1.).

	CONTROLES	ENTRENADOS
L.C.S.	234,8	258,83 *
D.E	33,53	17,99
Error estándar	10,60	7,35
N	10	6

Tabla 3.1 Valores de la media de la longitud del ciclo sinusal (L.C.S.) *in vivo*, de la desviación (D.E.) y del error estándar en los conejos control y sometidos a un protocolo de entrenamiento aeróbico. Valores expresados en ms. * $p \leq 0,04$

3.2. FRECUENCIA CARDIACA *IN VITRO*:

En relación con la frecuencia cardiaca estudiada en corazón aislado, observamos que el protocolo de entrenamiento utilizado por nuestro grupo, ha producido una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de la frecuencia cardiaca (aumento de la longitud del ciclo sinusal) en comparación a aquellos que no realizaron ejercicio (Tabla 3.2.)

	CONTROLES	ENTRENADOS
L.C.S.	286,73	322,44*
D.E.	32,33	32,33
Error estándar	10,22	9,33
N	10	12

Tabla 3.2. Valores promedios de la longitud del ciclo sinusal (L.C.S.) *in vitro* y sus correspondientes desviaciones (D.E.) y errores estándar del grupo control y el grupo sometido a un protocolo de entrenamiento de resistencia. Expresados en ms. * $p \leq 0,03$

3.3. CONCENTRACIÓN DE LACTATO EN SANGRE VENOSA:

Como bien puede verse en la tabla 3.3., la concentración de lactato en sangre durante la primera semana, se incrementó con respecto al valor basal, en la primera serie de carrera. Durante la cuarta semana, este incremento persistió ligeramente; mientras que en la última semana el incremento no fue notorio.

En relación con las series de entrenamiento, la concentración de lactato en sangre venosa durante la cuarta y sexta semana, no presentó diferencias significativas entre el valor basal y aquel después de cada una de las series en la que se determinó este parámetro.

LACTATO EN SANGRE			
	BASAL	Sesión 1	Sesión 6
Semana 1	3,3 ± 1,1 (11)	6,6 ± 2,6* (9)	7,1 ± 4,4 (7)
Semana 4	3,9 ± 1,6 (11)	6,4 ± 2,1 (11)	5,5 ± 2,2 (8)
Semana 6	4,0 ± 1,6 (10)	6,4 ± 2,4 (10)	3,9 ± 0,78 (7)

Tabla 3.3. Parámetros de entrenamiento: Media y desviación estándar de la frecuencia cardiaca *in vivo* y concentración de lactato en sangre venosa (Basal, Sesión 1, después de la primera serie y Sesión 6, al final de la última serie). Los valores están dados en $\mu\text{moles/l}$. Número de experimentos en paréntesis. * $p \leq 0.05$ versus valor de la concentración basal de lactato.

3.4. EXPRESIÓN DE LA OXIDO NÍTRICO SINTASA, iNOS Y DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP60:

El ejercicio físico indujo la expresión de la iNOS y la HSP60 en músculo cardíaco de conejo.

La evaluación densitométrica del análisis del Western Blotting de los extractos de proteína del músculo del corazón de conejo mostró un aumento significativo del $35\% \pm 10\%$ en la expresión de la HSP60 (Fig. 3.1) y un incremento de $51\% \pm 9\%$ en la expresión de la iNOS (Fig. 3.2) después de las 8 semanas de entrenamiento ($p \leq 0.05$ vs reposo).

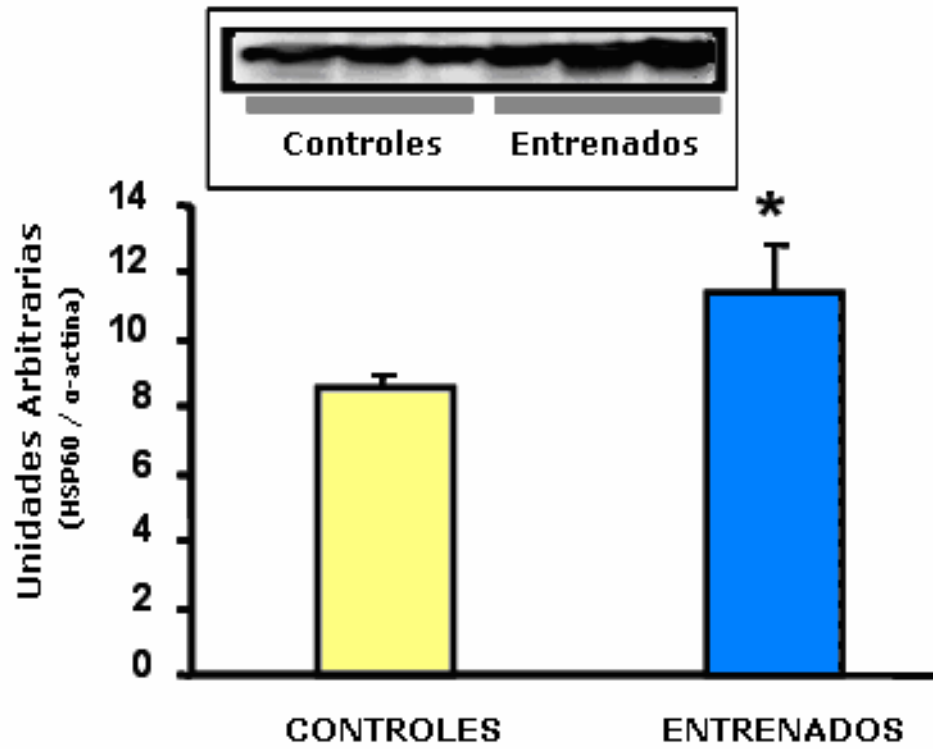


Fig. 3.1. Media y desviación estándar de la concentración de HSP60 en miocardio de conejos entrenados vs conejos controles. Valores expresados en unidades arbitrarias, en relación con la α -actina. * $p \leq 0,05$.

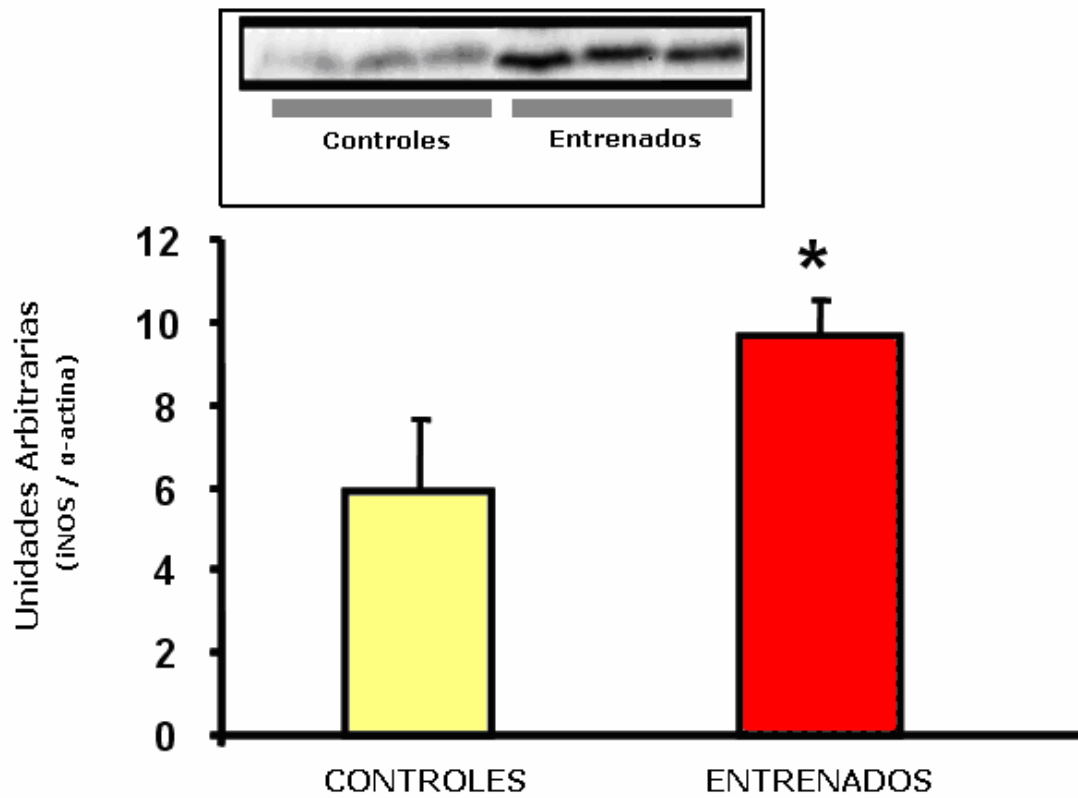


Fig. 3.2 Media y desviación estándar de la concentración de la iNOS en miocardio de conejos entrenados vs conejos controles. Valores expresados unidades arbitrarias, en relación con la α -actina. * $p \leq 0,05$.

4. DISCUSIÓN

4.1. ALGUNAS CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS.

En el presente trabajo hemos investigado en conejos los efectos de un protocolo de ejercicio físico crónico sobre algunos parámetros bioquímicos y electrofisiológicos, en corazones aislados, *in situ* y en sangre circulante, con el fin de contribuir a la caracterización de dicho protocolo.

Como han señalado diversos autores, el conejo de laboratorio es un modelo ideal para examinar los efectos del entrenamiento físico, ya que este animal es, a semejanza de los humanos en general, sedentario; y con protocolos de ejercicio de intensidad, duración y frecuencia apropiadas, se obtiene una respuesta cardiovascular propia del entrenamiento (Dicarlo y Bishop, 1990). Por otra parte el corazón de conejo en contraste con los corazones de otros animales, es de más fácil manipulación, lo que también contribuye a la elección del mismo. Respecto a la preparación utilizada en este trabajo para la perfusión del corazón, al no ser una preparación de corazón con carga (es decir, no es un *working heart*), las diferencias observadas entre los grupos experimentales no son debidas a variaciones en el trabajo cardiaco.

4.2. RESPECTO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

4.2.1. Frecuencia cardiaca *in vivo*:

Como vimos en el apartado de resultados, cuando determinamos la frecuencia cardiaca de los conejos al final del periodo de entrenamiento, previamente a la anestesia y sacrificio del animal, esto es, del corazón *in situ*, encontramos una disminución de este parámetro en los animales entrenados respecto al obtenido en los animales control. Este resultado parece indicar que la aplicación del protocolo de entrenamiento ha producido la esperada respuesta cardiovascular más representativa. Es conocido que una de las modificaciones más claras que exhibe el entrenamiento es la disminución de la frecuencia cardiaca. No solamente la frecuencia cardiaca submáxima disminuye con el entrenamiento, sino también la frecuencia cardiaca en reposo. La observación de una disminución de la frecuencia cardiaca en reposo ha sido descrita desde hace varias décadas (para revisión ver la referencia de Scheuer y Tipton, 1997). La razón que se aduce para explicar la disminución de la frecuencia cardiaca por entrenamiento es que como consecuencia del mismo se produce un incremento del tono vagal y por tanto implica a modificaciones de la

actividad relativa de los componentes del sistema nervioso autónomo o vegetativo, (Bedford y Tipton, 1987, De Schryver y Mertens-Strythagen, 1975, Seals y Chase, 1989, Shi *et al.*, 1995) aunque veremos más adelante en los resultados correspondientes a la frecuencia cardíaca *in vitro* y como han publicado otros autores, que componentes intrínsecos del corazón parecen participar en la disminución de la frecuencia cardíaca por el entrenamiento.

Aunque no ha sido objeto del presente trabajo y tampoco se ha hecho la correspondiente determinación, la disminución de la frecuencia cardíaca por el entrenamiento se acompaña de un incremento del volumen sistólico, también clásicamente descrito y al que algunos le atribuyen como mecanismo básico, un aumento de la contractilidad (Fletcher *et al.*, 2001), al aumento del volumen sistólico por aumento del retorno venoso debido a la ley de Frank-Starling (Schaible y Scheuer, 1985) y Pelliccia *et al.* (1991) lo relacionaron con el agrandamiento de las cámaras cardíacas.

4.2.2. Frecuencia cardíaca *in vitro*:

En lo que respecta a la frecuencia cardíaca analizada en el corazón aislado de conejo, hemos visto que la aplicación de nuestro

protocolo de entrenamiento parece haber deprimido ligeramente el automatismo sinusal, lo que se ha puesto de manifiesto en una mayor longitud del ciclo sinusal (parámetro inverso a la frecuencia cardiaca). El hecho de que esta modificación se haya producido en el corazón aislado y por tanto no sometido a la influencia del sistema nervioso extrínseco o a algún factor humoral, permite sugerir la participación de mecanismos del propio corazón en la modificación mencionada. Como contraste a nuestra observación, otros autores no encontraron cambios significativos en la frecuencia cardiaca en corazones aislados de animales entrenados (Tipton *et al.*, 1977). El componente intrínseco de la disminución de la frecuencia cardiaca, propio de los sujetos entrenados, ha sido relacionado con un agrandamiento cardiaco y con el estiramiento tónico del marcapaso sino-auricular, lo cual podría producir la dilatación auricular en los protocolos de entrenamiento de resistencia (Lewis *et al.*, 1980). También se ha planteado como consecuencia de la bradicardia intrínseca una modificación en el metabolismo de los miocitos cardiacos que resulta en una más eficiente utilización y generación de energía (Katona *et al.*, 1982). Finalmente para otros autores, la bradicardia producida por el entrenamiento podría estar relacionada con el llamado síndrome de la enfermedad del seno (Northcote *et al.*, 1989).

Nuestro grupo investigador ya observó un aumento de la longitud del ciclo sinusal en corazones aislados de conejos sometidos a un protocolo de entrenamiento de mayor intensidad que el que ha constituido objeto del presente trabajo. (Such *et al.*, 2002). En nuestras investigaciones previas descartamos la posibilidad de que la variación de la frecuencia cardiaca por el entrenamiento pudiera ser debida a modificaciones en la masa cardiaca, ya que la diferencia de peso del corazón procedente de animales entrenados y el de los animales control no fue significativa. También descartamos, como posible causa de la bradicardia relativa, la posibilidad de una lesión producida por el estrés oxidativo producido durante el proceso de realización del protocolo de entrenamiento, ya que una manifestación bioquímica de peroxidación lipídica por estrés oxidativo, que es el incremento de los niveles tisulares de malondialdehído, no se dio en mayor medida en los corazones de conejos entrenados que en los procedentes de conejos control (Such *et al.*, 2002).

4.2.3. Concentración de lactato en sangre venosa:

Con respecto a las concentraciones de lactato en sangre, hemos visto en el capítulo de resultados, la concentración de lactato

se incrementó con respecto al valor basal tras la primera serie de carrera al inicio del protocolo de entrenamiento (primera semana). Este incremento de la concentración de lactato tras la primera serie de carrera, si bien tendió a repetirse ($p=0,09$) a mitad del proceso de entrenamiento (cuarta semana), no se produjo al final del proceso de entrenamiento, es decir, a la sexta semana.

El incremento de la concentración de lactato tras la primera serie de carrera producida en la primera semana de entrenamiento, implica la participación de un componente metabólico anaerobio. No obstante, la implicación de este metabolismo anaeróbico va disminuyendo progresivamente con el transcurso del tiempo de aplicación del protocolo de entrenamiento. Efectivamente, en la última semana tras la primera serie de carrera no parece que tenga lugar la puesta en marcha del componente anaeróbico antes mencionado.

Por otra parte, analizando los resultados respecto a las concentraciones de lactato, salvo el incremento puntual al inicio del entrenamiento, ya comentado, no ha habido diferencias significativas en la concentración de lactato entre el valor basal y el correspondiente a la sexta serie de carrera a lo largo de las

diferentes etapas del proceso de entrenamiento escogidas para la determinación de la concentración de lactato (primera, cuarta y sexta semanas). Todo lo cual parece indicar que en general los animales se entrenan en condiciones tales que permiten que la energía sea obtenida más bien de los procesos metabólicos aeróbicos.

4.2.4. Expresión de la oxido nítrico sintasa, iNOS y de la proteína de choque térmico, HSP60:

Hemos determinado al final del proceso de entrenamiento la expresión de proteínas vitales necesarias para la adaptación al ejercicio (Gómez-Cabrera *et al*, 2005), en concreto la HSP60 y la iNOS. El óxido nítrico (NO) parece ser un regulador positivo muscular. La producción de NO aumenta durante el ejercicio y puede estar involucrada en el transporte de glucosa inducida por el ejercicio y en la producción de presión y flujo sanguíneo muscular esquelético (Roberts *et al*, 1999) Además diferentes autores han relatado el papel del NO como mediador de la protección contra la isquemia y las arritmias inducidas por reperfusión (Hajnal *et al*, 2005). También es importante sugerir la inducción por el ejercicio de

proteínas del estrés que pueden provocar protección miocárdica (Powers *et al*, 2001).

Las HSP son inducidas por gran variedad de condiciones estresantes como temperaturas elevadas, estrés oxidativo, variaciones en el pH, etc., y protegen a la célula contra el daño producido por estas condiciones. Diversos trabajos han sugerido que hay un aumento significativo en la expresión crónica de las HSP tras el incremento de actividad muscular esquelética (Locke y Noble, 1995). Además, investigaciones previas han demostrado tras la aplicación de ejercicios de resistencia en personas y animales, un incremento del potencial oxidativo del músculo esquelético (Dudley *et al*, 1982). Las HSP son necesarias para la translocación, protección y ensamblaje de precursores de enzimas oxidativos, por ello, el incremento en su actividad y expresión van paralelos. Nuestros datos muestran un aumento significativo en los niveles de proteína tanto de la iNOS como de la HSP60 después del periodo de entrenamiento.

En conclusión, la aplicación de nuestro protocolo de entrenamiento ha producido modificaciones de parámetros bioquímicos y electrofisiológicos que parecen indicar la consecución

de un mayor o menor estado de entrenamiento. Además, a la vista de los resultados obtenidos sobre las concentraciones de lactato el protocolo de entrenamiento seguido por nosotros, podemos decir que en líneas generales, tras un ligero periodo inicial de adaptación, el tipo de ejercicio realizado ha sido más bien de carácter aerobio. Por tanto, las modificaciones electrofisiológicas (tanto a nivel de automatismo sinusal como sobre la conducción auriculoventricular y sobre la refractariedad auricular, ventricular y del sistema de conducción auriculoventricular) que han exhibido los corazones aislados de conejo sometidos al presente protocolo, podemos decir que han sido producidas por la realización regular de ejercicio físico aeróbico.

Con el presente trabajo se han cumplimentado los diferentes objetivos que se plantearon, esto es, caracterizar desde un punto de vista bioquímico y electrofisiológico un protocolo de entrenamiento en conejos que puede ser usado para diversos estudios, no solamente de carácter electrofisiológico miocárdico, sino también de muy diversa índole (metabólico, hemodinámico, etc.).

No obstante lo anteriormente dicho, pensamos que como perspectiva, este trabajo de investigación sugiere ampliar el tipo de

estudio a través de, no solamente aumentar el número de experimentos, sino también el tipo de parámetros de entrenamiento. Así mismo, sugiere investigar los efectos de protocolos de intensidades sucesivamente menores a la intensidad aquí aplicada.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Hemos realizado una investigación en conejos, encaminada a caracterizar bioquímica y electrofisiológicamente un protocolo de ejercicio físico de resistencia en cinta rodante (velocidad de carrera: 20 m/min), con el fin de considerar su utilidad para realizar estudios dirigidos a analizar los efectos del entrenamiento sobre algunos parámetros electrofisiológicos del miocardio. Las conclusiones alcanzadas han sido:

- 1) La aplicación del protocolo ha exhibido manifestaciones electrofisiológicas *in vivo*, disminuyendo la frecuencia cardíaca en reposo.
- 2) Asimismo, la aplicación del protocolo, también se ha manifestado sobre el automatismo sinusal intrínseco, deprimiéndolo ligeramente.
- 3) El proceso de “entrenamiento” no solamente se manifiesta a nivel electrofisiológico sino también a nivel bioquímico.

- 4) El protocolo de entrenamiento en líneas generales se ha realizado en condiciones aeróbicas.

- 5) Como conclusión final, consideramos el presente protocolo como adecuado para la investigación que tiene como objeto esclarecer los efectos protectores del ejercicio físico aeróbico sobre las modificaciones eléctricas del corazón relacionadas con las arritmias de reentrada y por tanto con la muerte súbita.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Barbier J, Rannou-Bekono F, Marchais J, Berthon PM, Delamarche P, y Carré F. Effect of training on β_1 β_2 β_3 adrenergic y M_2 muscarinic receptors in rat heart. *Med. Sci. Sports Exercise* Vol 36 (6): 949 - 954, 2004.

Barron BA, Laughlin MH, y Gwirtz PA. Exercise effect on canine y miniswine cardiac catecholamines y enkephalins. *Med. Sci. Sports Exerc.* Vol 29 (10): 1338 - 1343, 1997.

Becker V, González-Serratos H, Álvarez R, Bareman M, Irlles C, y Ortega A. Effect of endurance exercise on the Ca^{2+} pums from transverse tubule y sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 97: 467 - 474, 2004.

Bedford TG, y Tipton CM. Exercise training y the arterial baroreflex. *J. Appl. Physiol.* 63 (5): 1926 - 1932, 1987.

Bonen A. Lactate transporters (MCT proteins) in heart y skeletal muscles. *Med. Sci. Sports Exerc.* Vol. 32 (4): 778 - 789, 2000.

Buckwalter JB, y Clifford PS. α -Adrenergic vasoconstriction in active skeletal muscles during dynamic exercise. *Am. J. Physiol.* 277 (46): H33 - H39, 1999.

Carroll JF, Thaden JJ, y Wright AM. A comparison of two exercise training programs on cardiac responsiveness to β -stimulation in obesity. *Exp. Biol. Med.* 230: 180 - 188, 2005.

Carroll JF. y Kyser CK. Exercise training in obesity lowers blood pressure independent of weight change. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34 (4): 596 - 601, 2002.

Carroll JF. Isolated heart responsiveness to β -stimulation alter exercise training in obesity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35 (4): 548 - 554, 2003.

Chen HI y Li HT. Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. *Arteriosclerosis y Trombosis* 13: 852 - 856, 1993.

De Moraes R, Gioseffi G, Lóbrega ACL, y Tibiriçá E. Effects of exercise training on the vascular reactivity of the whole kidney circulation in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 97: 683 - 688, 2004.

De Schryver C, y Mertens-Strythagen J. Heart tissue acetylcholine in chronically exercised rats. *Experientia* 31: 316 - 318, 1975

Demirel HA, Powers SK, Caillaud C, Coombes JS, Naito H, Fletcher LA, Vrabas I, Jessup JV, y Ji LL. Exercise training reduces myocardial lipid

peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Med. Sci. Sports Exerc.* Vol. 30 (8): 1211 - 1216, 1998.

DiCarlo SE, y Bishop VS. Exercise training attenuates baroreflex regulation of nerve activity in rabbits. *Am. J. Physiol.* 255 (24): H974 - H979, 1988.

DiCarlo SE, y Bishop VS. Exercise training enhances cardiac afferent inhibition of baroreflex function. *Am. J. Physiol.* 258: H212 - H220, 1990.

DiCarlo SE, y Bishop VS. Regional vascular resistance during exercise: role of cardiac afferents y exercise training. *Am. J. Physiol.* 258: H842 - H847, 1990.

Doménech, E. Efecto de la administración de antioxidantes orales en las adaptaciones al ejercicio físico. Tesis doctoral. Universitat de València. 2006.

Dudley GA, Abraham WM, y Terjung RL. Influence of exercise intensity y duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 53: 844 - 850, 1982.

Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R, Fleg J, Froelicher VF, Leon AS, Piña IL, Rodney R, Simons-Morton DG, Williams MA y Bazzarre T. Exercise Standards for Testing y Training. A Statement for Healthcare Professionals. *Circulation* 104: 1694-1740, 2001.

Fogarty JA, Muller-Delp JM, Delp MD, Mattox ML, Laughlin MH, y Parker JL. Exercise training enhances vasodilation responses to vascular endothelial growth factor in porcine coronary arterioles exposed to chronic coronary occlusion. *Circulation* 109: 664 - 670, 2004.

Gómez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, y Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J. Physiol.* 567: 113 - 120, 2005.

Gonzales, JA, Szeto A, Mendez AJ, Zaias J, Paredes JP, Caperton CV, Llabre MM, Levine JE, Goldberg RB, Schneiderman N y McCabe PM. Effect of behavioral interventions on insulin sensitivity y atherosclerosis in the Watanable Heritable Hyperlipidemic rabbit. *Psychosomatic Medicine* 67: 172 - 178, 2005.

Hajnal A, Nagy O, Litvai A, Papp J, Parratt JR, y Vegh A. Nitric oxide involvement in the delayed antiarrhythmic effect of treadmill exercise in dogs. *Life. Sci.* 77: 1960 - 1971, 2005.

Hamann JJ, Buckwalter JB, Valic Z, y Clifford PS. Sympathetic restraint of muscle blood flow at the onset of dynamic exercise. *J. Appl. Physiol.* 92: 2452 - 2456, 2002.

Hayward R, Ruangthai R, Schneider CM, Hyslop RM, Strange R, y Westerlind KC. Training Enhances vascular relaxation after chemotherapy-induced vasoconstriction. *Med. Sci. Sports Exerc.* Vol. 36 (3): 428 - 434, 2004.

Henderson KK, Turk JR, Rush JW, y Laughlin MH. Endothelial function in coronary arterioles from pigs with early-stage coronary disease induced by high-fat, high-cholesterol diet: effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* 97: 1159 - 1168, 2004.

Hexeberg E, Westby J, Hessevik I, y Hexeberg S. Effects of endurance training of left ventricular performance : a study in anaesthetized rabbits. *Acta Physiol. Scand.* 154 (4): 479 - 488, 1995.

Jen C, Chan HP, y Chen HI. Chronic exercise improves endothelial calcium signaling y vasodilatation in hypercholesterolemic rabbit femoral artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 1219 - 1224, 2002.

Jover B, McGrath B, y Ludbrook J. Haemodynamic y metabolic responses of laboratory rabbits to near-máximal treadmill exercise. *Clinical y Experimental Pharmacology & Physiology* 14: 811 - 823, 1987.

Juel, C. Expression of the Na⁺/H⁺ enchaner isoform NHE1 in rat skeletal muscle y effect of training. *Acta Physiol. Scand.* 170: 59 - 63, 2000.

Katona PG, McLean M, Dighton DH y Guz A. Smpathetic y parasymphetic cardiac control in atheletes y non-athletes at rest. *J. Appl. Physiol.* 52: 1652 - 1657, 1982.

Korte FS, Mokelke EA, Sturek M, y McDonald KS. Exercise improves impaired ventricular function y alterations of cardiac myofibrillar proteins in diabetic dyslipidemic pigs. *J. Appl. Physiol.* 98: 461 - 467, 2005.

Korzick DH, Laughlin MH, y Bowles DK. Alterations in PKC signaling underlie enhanced myogenic tone in exercise-trained porcine coronary resistance arteries. *J. Appl. Physiol.* 96: 1425 - 1432, 2004.

Korzick DH, Rishel ME, y Bowles DK. Exercise y hypercholesterolemia produce disparate shifts in coronary PKC expression. *Med. Sci. Sports Exerc.* Vol. 37 (3): 381 - 388, 2005.

Laughlin MH, Welshons WV, Sturek M, Rush JV, Turk JR, Taylor JA, Judy BM, Henderson KK, y Ganjam VK. Gender, exercise training, y eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries. *J. Appl. Physiol.* 95: 250 - 264, 2003.

Lewis SF, Nylander E, Gad P y Areskog N. Non- autonomic component in bradycardia of endurance trained men at rest y during exercise. *Acta Physiol. Scand.* 109: 297 - 305, 1980.

Liu JL, Irving S, Reid IA, Patel KP, y Zucker IH. Chronic exercise reduces sympathetic nerve activity in rabbits with pacing-induced heart failure. A role for Angiotensin II. *Circulation* 102: 1854 - 1862, 2000.

Liu JL, Kulakofsky J, y Zucker I. Exercise training enhances baroreflex control of heart rate by a vagal mechanism in rabbits with heart failure. *J. Appl. Physiol.* 92: 2403 - 2408, 2002.

Lloyd PG, Prior BM, Li H, Yang HT, y Terjung RL. VEGF receptor antagonism blocks arteriogenesis, but only partially inhibits angiogenesis, in skeletal muscle of exercise-trained rats. *Am. J. Physiol.* 288: H759 - H768, 2005.

Locke M, y Noble EG. Stress proteins: the exercise response. *Can. J. Appl. Physiol.* 20: 155 - 167, 1995.

Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Feild MR, Ianuzzo SE, y Ianuzzo CD. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock y exercise. *Am. J. Physiol.* 268 (37): C1387 - C1394, 1995.

Martins AS, Crescenzi A, Stern JE, Bordin S, y Michelini LC. Hypertension y Exercise training differentially affect oxytocin y oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension* 46: 1004 - 1009, 2005.

Mattson JP, Ross CR, Kilgore JL, y Musch TI. Induction of mitochondrial stress proteins following treadmill running. *Med. Sci. Sports Exerc.* Vol 32 (2): 365 - 369, 2000.

McAllister RM, Jasperse, JL, y Laughlin. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 98: 753 - 761, 2005.

Mueller PJ, O'Hagan KP, Scogg KA, Buckwalter JB, y Clifford PS. Renal hemodynamic responses to dynamic exercise in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 85 (5): 1605 - 1614, 1998.

Muller JM, Myers PR, y Laughlin MH. Exercise training alters myogenic responses in porcine coronary resistance arteries. *J. Appl. Physiol.* 75 (6): 2677 - 2682, 1993.

Muller JM, Myers PR, y Laughlin MH. Vasodilator responses of coronary resistance arteries of exercise-trained pigs. *Circulation* 89: 2308 - 2314, 1994.

Northcote RJ, Gordon PC y Ballantyne D. Electrocardiographic findings in male veteran endurance athletes. *Br. Heart. J.* 61: 155 - 160, 1989.

O'Hagan KP, Bell LB, Mittelstadt SW, y Clifford PS. Effect of dynamic exercise on renal sympathetic nerve activity in conscious rabbits. *J. Appl. Physiol.* 74 (5): 2099 - 2104, 1993.

O'leary DS, Rossi NF, y Churchill PC. Substantial cardiac parasympathetic activity exists during heavy dynamic exercise in dogs. *Am. J. Physiol.* 273 (42): H2135 - H2140, 1997.

Oltman CL, Parker JL, Adams HR, y Laughlin MH. Effects of exercise training on vasomotor reactivity of porcine coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 263 (32): H372 - H382, 1992.

Oltman CL, Parker JL, y Laughlin MH. Endothelium-dependent vasodilation of proximal coronary arteries from exercise-trained pigs. *J. Appl. Physiol.* 79 (1): 33 - 40, 1995.

Pelliccia A, Maron BJ, Spataro A, Proschan MA y Spirito P. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *N. Eng. J. Med.* 324: 295 - 301, 1991.

Pliquett, RU, Cornish KP, Patel KP, Schultz HD, Peueler JD, y Zucker IH. Amelioration of depressed cardiopulmonary reflex control of sympathetic nerve activity by short-term exercise training in male rabbits with heart failure. *J. Appl. Physiol.* 95: 1883 - 1888, 2003.

Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, y Jessup J. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am. J. Physiol.* 275 (44): R1468 - R1477, 1998.

Powers SK, Locke M, y Demirel HA. Exercise, heat shock proteins, y myocardial protection from I-R injury. *Med. Sci. Sports Exerc* 33: 386 - 392, 2001.

Roberts CK, Barnard RJ, Jasman A, y Balon TW. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 277: E390 - 394, 1999.

Rogers PJ, Miler TD, Bauer BA, Brum JM, Bove AA, y Vanhoutte PM. Exercise training y responsiveness of isolated coronary arteries. *J. Appl. Physiol.* 71 (6): 2346 - 2351, 1991.

Rush JW, Turk JR, y Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 y oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am. J. Physiol.* 284: H1378 - H1387, 2003.

Schaible T y Scheuer J. Cardiac adaptations to chronic exercise. *Progress in cardiovascular diseases* 27: 297 - 324, 1985.

Scheuer J y Tipton, CM. Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann. Rev. Physiol.* 39: 221 - 251, 1997.

Seals DR, y Chase PB. Influence of physical training on HR variability y baroreflex circulatory control. *J. Appl. Physiol.* 66: 1886 - 1895, 1989.

Seo TB, Han IS, Yoon JH, Hong KE, y Yoon SJ. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* Vol 38 (7): 1267 - 1276, 2006.

Setty S, Sun W, Martinez R, Downey HF, y Tune JD. α -Adrenoreceptor-mediated coronary vasoconstriction in augmented during exercise in experimental diabetes mellitus. *J. Appl. Physiol.* 97: 431 - 438, 2004.

Shi X, Stevens G HJ, Foresman BH, Stern SA, y PB Raven. Autonomic nervous system control of the heart: endurance exercise training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 1406 - 1413, 1995.

Spier SA, Laughlin MH,, y Delp MD. Effects of acute y chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta. *J. Appl. Physiol.* 87 (5): 1752 - 1757, 1999.

Srere PA. Citrate Synthase. *Methods Enzymol.* 13:3 - 11, 1969.

Such L, Rodríguez A, Alberola A, López L, Ruiz R, Artal L, Pons I, Pons ML, García C y Chorro FJ. Intrinsic changes on automatism, conduction, y refractoriness by exercise in isoled rabbit heart. *J. Appl. Physiol.* 92: 225 - 229, 2002.

Such LM, López L, Benítez J, Trapero I, Chorro FJ, Such L, Gómez MC y Alberola A. Effects of physical training on the intrinsic atrial refractoriness. *J. Physiol. Biochem.* 61: 295, 2005.

Szabo A, Romvari R, Bogner P, Febel H, y Szendro Z. Metabolic changes induced by regular submáximal aerobic exercise in meat-type rabbits. *Acta Veterinaria Hungarica* 51 (4): 503 - 512, 2003.

Tagarakis CVM, Bloch W, Hartmann G, Hollmann W, y Addicks K. Testosterone-propionato impairs the response of the cardiac capillary bed to exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* Vol 32 (5): 946 - 953, 2000.

Taylor RP, Harris MB, y Starnes JW. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am. J. Physiol.* 276 (45): H1096 - H1102, 1999.

Tipton CM, Matthes RD, Tcheng T, Dowell RT y Vailas AC. The use of Langendorff preparation to study the bradycardia of training. *Med. Sci. Sports* 9: 220 - 230, 1977.

Tipton, CM, Crey RA, Eastin WC, y Erickson HH. A submaximal test for dogs: evaluation of effects of training, detraining, y cage confinement. *J. Appl. Physiol.* 37 (2): 271 - 275, 1974.

Wang J, Wolin MS, y Hintze TH. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ. Res.* 73: 829 - 838, 1993.

Wisløff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, y Ellingsen Ø. Increased contractility y calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovascular Research* 50: 495 - 508, 2001.

Woodman CR, Ingram D, Bonagura J, y Laughlin MH. Exercise training improves femoral artery blood flow responses to endothelium-dependent dilators in hypercholesterolemic pigs. *Am. J. Physiol.* 290: H2362 - H2368, 2006.

Woodman CR, Thompson MA, Turk JR, y Laughlin MH. Endurance exercise training improves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hypercholesterolemic male pigs. *J. Appl. Physiol.* 99: 1412 - 1421, 2005.

Woodman CR, Turk JR, Rush JW, y Laughlin MH. Exercise attenuates the effects of hypercholesterolemia on endothelium-dependent relaxation in coronary arteries from adult female pigs. *J. Appl. Physiol.* 96: 1105 - 1113, 2004.

Woodman CR, Turk JR, Williams DP, y Laughlin MH. Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs. *J. Appl. Physiol.* 94: 2017 - 2026, 2003.

Yang AL, y Chen HI. Chronic exercise reduces adhesión molecules/iNOS expression y partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis* 169: 11 - 17, 2003.

Yang AL, Jen ChJ, y Chen HI. Effects of high-cholesterol diet y parallel exercise training on the vascular function of rabbit aortas: a time course study. *J. Appl. Physiol.* 95: 1194 - 1200, 2003.

Yoshinari K, Yaoita H, Maechara K, y Maruyama Y. Different therapeutic responses to treadmill exercise of heart failure due to ischemia y infarction in rats. *Cardiovascular Research* 65: 457 - 468, 2005.

