

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

Departament de Fisiologia

Estudio de la posible participación de la corriente I_{KATP} en las modificaciones que sobre estabilidad y heterogeneidad miocárdica produce el ejercicio físico crónico, en corazón aislado, normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda.

Tesis Doctoral presentada por:

Manuel Koninckx Cañada

Dirigida por:

Dr. D. Luis Such Belenguer

Dr. D. Luis Such Miquel


Dr. D. Germán Parra Giraldo

Valencia, 2014

El **Dr. D. Luis Such Belenguer**, Catedrático de Universidad del Departament de Fisiologia de la Universitat de València-Estudi General, el **Dr. D. Luis Such Miquel**, Profesor Contratado Doctor del Departament de Fisioteràpia de la Universitat de València-Estudi General y el **Dr. D. Germán Parra Giraldo**, Profesor del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Surcolombiana:

CERTIFICAN, que el trabajo experimental que lleva por título “**Estudio de la posible participación de la corriente I_{KATP} en las modificaciones que sobre estabilidad y heterogeneidad miocárdica produce el ejercicio físico crónico, en corazón aislado, normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda**”, presentado por Manuel Koninckx Cañada para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departament de Fisiologia de la Universitat de València-Estudi General.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia, noviembre de 2014.



Dr. D. Luis Such Belenguer



Dr. D. Luis Such Miquel



Dr. D. Germán Parra Giraldo

La presente tesis doctoral ha podido ser realizada con la ayuda del antiguo Ministerio de Ciencia e Innovación al proyecto de investigación titulado “Efectos del entrenamiento sobre las modificaciones que la isquemia miocárdica produce en parámetros electrofisiológicos arritmogénicos. Implicación de la corriente $I_{K_{ATP}}$ ”, con referencia DEP2010-22318-C02-01, vigente hasta el 2013, y cuyo investigador principal es el doctor don Luis Such Belenguer.

- Agradecimientos -

Profundo agradecimiento a mis directores. Al profesor Luis Such Belenguer, por acogerme desde el primer día y dejarme formar parte de su formidable equipo de investigación, por su ímpetu en la consecución de ayudas para poder materializar las inquietudes investigadoras del equipo y poder así desarrollarnos profesionalmente, por mostrar siempre una capacidad de entrega y lucha a pesar de las continuas adversidades manifiestas en el terreno de la investigación, y, sobre todo, por luchar “codo con codo” conmigo mostrándome siempre una actitud de amistad, respeto y confianza. Al profesor Luis Such Miquel, por sus más que acogidas recomendaciones durante la elaboración de este manuscrito y por su rigurosidad, pasión y compromiso transmitidos durante los experimentos. Al profesor Germán Parra Giraldo, por estar siempre dispuesto a ayudarme cuando lo he requerido.

Gracias al profesor Antonio Alberola, quien fue mi primer mentor y referencia en el Departamento de Fisiología. Gracias a él pude dar con éxito mis “primeros pasos” en el mundo de la investigación y asentar unas bases sólidas que han servido para poder realizar y completar el presente proyecto.

Mi más sincero agradecimiento a don Juan Ezquer Borrás, tutor durante mi residencia en el Hospital Clínico de Valencia, por su permanente aprecio mostrado hacia mí desde el primer momento en que me incorporé al Servicio de Farmacia, y quién, recomendándome

al profesor Luis Such Belenguer, me ayudó en el inicio de este desafío.

Gracias a toda la “muchachada”. Es de destacar la inmejorable sintonía que hay en el grupo, facilitando, sin lugar a dudas, que se logren mucho mejor todos los retos. Ha sido una verdadera suerte haber compartido con ellos también algunos “momentos de júbilo”, permitiéndome confirmar las personas formidables que son. Especial agradecimiento a Irene y a Laia, quienes me han ayudado siempre y de forma excelente e incondicionada, teniéndolas como referencia y apoyo durante estos años.

Profundo y particular reconocimiento a mis seres más queridos, quienes con su apoyo, cariño y consejo, consiguen que ningún día desvanezcan mis ganas de luchar. En especial a mi hermana; a mis padres, por haber invertido tanto, o mejor dicho, todo en mí, para intentar que logre una digna meta en lo profesional y en lo personal; y a Marta, quien he tenido la suerte de conocer durante esta etapa mía y con quien quisiera compartir todos los malos y buenos momentos que me esperan. Todos ellos han sido claves durante el camino y consecución de esta “epopeya”, como es una tesis doctoral.

- Abreviaturas -

ACC: arteria coronaria circunfleja.

ADP: adenosina difosfato.

ATP: adenosina trifosfato.

ATP_i: adenosina trifosfato intracelular.

CV: coeficiente de variación.

DMSO: dimetil sulfóxido.

DPA: duración del potencial de acción.

ECG: electrocardiograma.

E_{Na}: potencial de equilibrio para el sodio.

FD: frecuencia dominante.

FDM: frecuencia dominante media.

FV: fibrilación ventricular.

I_b: corriente de entrada (inespecífica).

I_{CaL}: corriente de entrada de calcio de larga duración.

I_{CaT}: corriente de entrada de calcio transitoria.

ICC: insuficiencia cardiaca congestiva.

I_f: corriente de entrada (marcapasos).

I_K: corriente de potasio rectificadora retardada.

I_{K1} o I_{KIR}: corriente de rectificación interna de potasio.

I_{KAA}: corriente de potasio rectificadora externa.

I_{KAch}: corriente de potasio activada por acetilcolina

I_{KATP}: corriente de potasio ATP dependiente.

I_{KNa}: corriente de potasio activada por sodio.

I_{Kur}: corriente de potasio de rectificación tardía ultra-rápida.

I_{Na}: corriente de entrada rápida de sodio.

I_{NCX}: corriente iónica generada por el intercambiador Na⁺/Ca²⁺.

I_{sus} o I_{late} : corriente repolarizante de potasio de inactivación lenta

I_{to} : corriente transitoria de salida de potasio.

K_{ATP} : canal de potasio ATP dependiente.

kDa: kilodalton.

K_{ir} : canal de potasio de rectificación interna.

K_{r} : canal rectificador retardado rápido de potasio.

K_{s} : canal rectificador retardado lento de potasio.

mito K_{ATP} : canal de potasio ATP dependiente mitocondrial.

μM : micromolar.

mM: milimolar.

MnSOD: superóxido dismutasa de manganeso.

ms: milisegundo.

NBD: dominio de unión de nucleótidos.

P5: percentil 5.

PA: potencial de acción.

PRE: periodo refractario efectivo.

PRFFV: periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.

pS: picosiemens.

sarc K_{ATP} : canal de potasio ATP dependiente sarcolémico.

SN: sistema nervioso.

SUR: receptor de las sulfonilureas.

TMD: dominio transmembrana.

- Índice -

Capítulo 1. Introducción.....	5
1.1. Objetivos.....	7
1.2. Justificación de los objetivos.....	9
1.2.1. Consideraciones fundamentales acerca de la actividad eléctrica del corazón.....	9
1.2.1.1. Electrofisiología normal.....	9
1.2.1.2. Modificaciones electrofisiológicas arritmogénicas en la isquemia aguda.....	15
1.2.2. El canal de potasio ATP sensible miocárdico y su comportamiento en las modificaciones fisiopatológicas debidas a la isquemia aguda.....	25
1.2.2.1. Estructura molecular de los canales K_{ATP} miocárdicos.....	26
1.2.2.2. Actividad de los canales K_{ATP} miocárdicos y su modulación.....	30
1.2.2.3. Controversias en relación al papel de los canales K_{ATP} miocárdicos.....	36
1.2.2.3.1. Efecto protector sobre el cardiomiocito isquémico debido a la apertura de los canales K_{ATP}	37
1.2.2.3.2. Efecto protector sobre el cardiomiocito isquémico debido al cierre de los canales K_{ATP}	41
1.2.3. El ejercicio físico crónico como maniobra protectora miocárdica.....	46
1.2.3.1. Generalidades.....	46
1.2.3.2. Estudio especial de los efectos electrofisiológicos del ejercicio físico crónico.....	51

1.2.3.2.1. Efecto del ejercicio físico crónico sobre la refractariedad miocárdica.....	51
1.2.3.2.2. Efecto del ejercicio físico crónico sobre la heterogeneidad electrofisiológica.....	53
1.2.3.2.3. Efecto del ejercicio físico crónico sobre el proceso de activación eléctrica del miocardio.....	56
1.2.4. Participación de los canales K_{ATP} en los efectos electrofisiológicos beneficiosos del ejercicio físico crónico sobre el miocardio sometido a isquemia aguda.....	57
1.3. Resumen de la justificación de los objetivos. Hipótesis de trabajo.....	66
1.4. Plan de trabajo.....	67
Capítulo 2. Material y métodos.....	69
2.1. Material.....	71
2.1.1. Animales de experimentación.....	71
2.1.2. Reactivos.....	71
2.1.3. Aparatos.....	72
2.1.4. Programas informáticos.....	79
2.2. Métodos.....	80
2.2.1. Condiciones de estabulación de los conejos.....	80
2.2.2. Protocolo de entrenamiento físico de los conejos.....	81
2.2.3. Estudio electrofisiológico.....	82
2.2.3.1. Preparación experimental.....	82
2.2.3.2. Protocolo experimental.....	85
2.2.3.3. Marcaje de los registros electrográficos.....	87
2.2.3.4. Parámetros estudiados: definición y determinación de los mismos.....	92

2.3. Grupos de estudio.....	115
2.4. Análisis estadístico.....	115
2.5. Legislación.....	116
2.6. Financiación.....	116
Capítulo 3. Resultados.....	117
3.1. Longitud del ciclo durante la fibrilación ventricular.....	119
3.2. Dispersión del ciclo durante la fibrilación ventricular.....	122
3.3. Periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.....	124
3.4. Dispersión del periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.....	126
3.5. Dispersión de la frecuencia dominante durante la fibrilación ventricular.....	129
3.6. Complejidad total de la activación miocárdica durante la fibrilación ventricular.....	131
3.7. Grados específicos de complejidad de la activación miocárdica durante la fibrilación ventricular.....	133
Capítulo 4. Discusión.....	139
4.1. Consideraciones generales.....	141
4.2. Consideraciones relativas a los métodos empleados.....	142
4.2.1. Respecto a los animales de experimentación.....	142
4.2.2. Respecto al sistema de perfusión tipo Langendorff.....	143
4.2.3. Respecto a la metodología para la determinación de los parámetros electrofisiológicos.....	144

4.3. Consideraciones relativas a los resultados obtenidos y su significado.....	146
4.3.1. Respecto a la refractariedad miocárdica.....	146
4.3.2. Respecto a la heterogeneidad electrofisiológica.....	153
4.3.2. Respecto a la complejidad de la activación eléctrica.....	162
4.4. Limitaciones del estudio.....	168
4.5. Consideraciones finales respecto a los resultados obtenidos. Posibles implicaciones del presente estudio en el área de la Salud.....	171
Capítulo 5. Conclusiones.....	173
Capítulo 6. Referencias bibliográficas.....	179

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1. Objetivos.

En líneas generales, diremos que en el presente estudio se pretende investigar en corazón aislado de conejo, normalmente oxigenado y sometido a isquemia aguda regional, las modificaciones que produce el ejercicio físico crónico sobre la refractariedad miocárdica y la dispersión de la misma, como parámetros de heterogeneidad miocárdica, así como la complejidad de la activación eléctrica durante la fibrilación ventricular (FV) como parámetro sobre el que se asientan diversas propiedades electrofisiológicas del miocardio. Asimismo, se pretende investigar si el ejercicio físico ha podido operar, en el miocardio sometido a isquemia regional aguda, a través de modulaciones del canal de potasio ATP dependiente (K_{ATP}) del cardiomiocito.

Así pues los objetivos concretos han sido:

- En el corazón aislado y perfundido de conejo, en fibrilación ventricular, procedente de un grupo de animales sometidos a un protocolo de entrenamiento físico y de un grupo control, en situación de perfusión normalmente oxigenada y tras provocar isquemia regional:

(a) Como parámetros indirectos y directos de refractariedad, y de heterogeneidad:

- La longitud del ciclo durante la fibrilación ventricular y la dispersión del mismo.

- El periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular y la dispersión del mismo.
 - La dispersión de la frecuencia dominante durante la fibrilación ventricular.
- (b) Como parámetro que se asienta no solamente sobre la refractariedad sino sobre otros parámetros electrofisiológicos, como la velocidad de conducción y la heterogeneidad:
- La complejidad de la activación eléctrica miocárdica durante la fibrilación ventricular.
- En el corazón aislado y perfundido de conejo, en fibrilación ventricular, sometido al bloqueo de los canales que vehiculan la corriente del canal K_{ATP} ($I_{K_{ATP}}$), procedente de un grupo de animales control, en situación de perfusión normalmente oxigenada y tras provocar isquemia regional:

(a) Como parámetros indirectos y directos de refractariedad, y de heterogeneidad:

- La longitud del ciclo durante la fibrilación ventricular y la dispersión del mismo.
- El periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular y la dispersión del mismo.
- La dispersión de la frecuencia dominante durante la fibrilación ventricular.

(b) Como parámetro que se asienta no solamente sobre la refractariedad sino sobre otros parámetros electrofisiológicos, como la velocidad de conducción y la heterogeneidad:

- La complejidad de la activación eléctrica miocárdica durante la fibrilación ventricular.

1.2. Justificación de los objetivos.

1.2.1. Consideraciones fundamentales acerca de la actividad eléctrica del corazón.

1.2.1.1. Electrofisiología normal.

Las células del nodo sinusal, tal y como se muestra en la figura 1.1, se caracterizan por presentar la llamada despolarización diastólica espontánea. Las corrientes implicadas en la aparición de este potencial de marcapasos inestable son (Opie, 2004):

- I_{CaT} : Componente transitorio de una corriente de entrada de calcio con un potencial umbral de aproximadamente de -50 mV a -60 mV.
- I_{CaL} : Corriente de entrada de calcio lenta. Posee un umbral de alrededor -40 mV. Esta segunda corriente opera posteriormente a la anterior.

- I_K : Esta corriente de potasio rectificadora retardada es activada por la despolarización en cuanto alcanza el ápex del potencial de acción (PA). Contribuye a la repolarización, pero en la medida que va decayendo permite a las corrientes de entrada tomar el control e iniciar la siguiente onda de despolarización. Esta corriente y su caída preceden a las dos anteriores.

Otras corrientes también implicadas en la despolarización diastólica, y por tanto en la actividad marcapasos, son la I_f , probablemente operativa sólo cuando el nódulo sinusal está hiperpolarizado; y las corrientes de fondo I_p o I_b , que permanecen cuando las otras son bloqueadas.

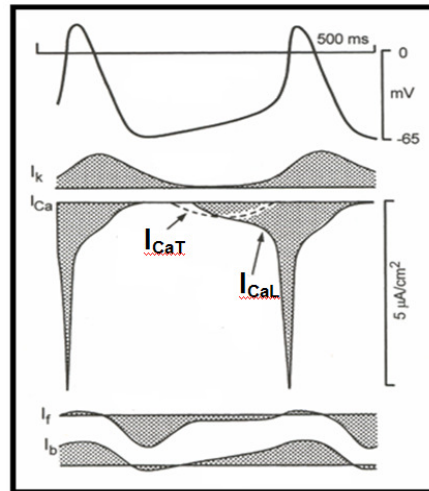


Figura 1.1. Corrientes marcapasos en el nodo sinusal. I_K , corriente de potasio rectificadora retardada; I_{CaT} , corriente de entrada de calcio transitoria; I_{CaL} , corriente de entrada de calcio de larga duración; I_f , corriente de entrada (marcapasos) y I_b , corriente de entrada (inespecífica). Tomado de Opie, 2004.

En relación al nodo auriculoventricular, hay que decir que muchas de las propiedades electrofisiológicas de este territorio se asemejan estrechamente a las del nodo sinusal, dándose en él despolarización diastólica.

Otras células que presentan un potencial de reposo inestable son las células de Purkinje. Si bien la pendiente de despolarización diastólica que el tejido nodal anteriormente citado.

Finalmente, hay que decir que las células miocárdicas de trabajo no presentan despolarización diastólica, manteniéndose estable el potencial de reposo en tanto y cuanto no llegue al cardiomiocito la onda de excitación originada en el nodo sinusal.

En cuanto al potencial de acción y las corrientes implicadas en el mismo, existen también diferencias entre los tipos celulares. El potencial de acción de las células marcapasos del nodo sinusal se dispara cuando el potencial de reposo alcanza el valor de alrededor de -40 mV. Las corrientes que participan en el mismo son la I_{CaL} (despolarización) y la I_K (repolarización). Las corrientes que participan en el desencadenamiento del proceso despolarizante y repolarizante en las células miocárdicas de trabajo son: I_{Na} (despolarización), que es una corriente de entrada rápida de sodio presente en los cardiomiocitos auriculares, ventriculares y en células de Purkinje; y las corrientes repolarizantes que describiremos a continuación en relación con las fases del potencial de acción de las células miocárdicas de trabajo (figura 1.2.). Estas son (Jalife et al., 2009; Oudit & Backx, 2009; Li & Dong, 2010):

- La **fase 0** abarca la fase de despolarización. Es rápida, de gran amplitud y en la que el valor del potencial se hace menos negativo, incluso llegando a valores positivos. Esto se debe a la participación de canales rápidos de sodio voltaje-dependientes, antes citados, que se abren una vez que la célula alcanza el nivel umbral (en aproximadamente -65 mV) y permiten la entrada rápida de Na^+ al interior de la célula, revirtiendo el valor del potencial a valores positivos en aproximadamente 1 milisegundo (ms). Pero una vez

activados estos canales y el valor del potencial se ha acercado al potencial de equilibrio para el sodio (E_{Na}), aproximadamente de +40 mV, la fuerza impulsora que introduce Na^+ al interior de la célula disminuye, los canales rápidos de sodio se inactivan y se empiezan a activar las corrientes repolarizantes. Por lo que el potencial no llega a alcanzar el E_{Na} , quedando en valores cercanos a +20 mV.

- Una vez que se alcanza el valor máximo de potencial, se produce una rápida repolarización transitoria, lo que da lugar a la **fase 1** del PA. En este momento la corriente rápida de Na^+ se encuentra inactivada y se activa la corriente transitoria de salida de potasio (I_{to}). Esta corriente es voltaje dependiente y tiene su umbral de activación a -30 mV, inactivándose rápidamente al inicio de la meseta del PA. En las células auriculares esta fase es muy prominente debido a la gran abundancia de canales vinculados a la corriente I_{to} y a su rápida reactivación. Las células de Purkinje (red) también poseen una prominente fase 1, siendo menos importante en las células del haz de His.

- Sigue la **fase 2** o meseta, en la que el valor del potencial de membrana se mantiene relativamente constante durante unos segundos. En este momento existe un equilibrio entre las corrientes despolarizantes, corriente de entrada de Ca^{2+} por los canales tipo L, y las repolarizantes, corrientes de salida de K^+ . Esta salida de K^+ ocurre a través de los rectificadores retardados (K_r y K_s). En las aurículas está activa la corriente ultra-rápida de potasio de rectificación tardía (I_{Kur}), hiperpolarizante, y que contribuye a la menor fase de meseta del PA auricular. Al final de esta fase actúa también el intercambiador

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (I_{NCX}) que es electrogénico (expulsa un ión de calcio e introduce tres de sodio) y contribuye a mantener el potencial de membrana en valores positivos.

- En la **fase 3** del potencial de acción predomina la puesta en marcha de la corriente de salida de potasio a través del llamado rectificador anómalo (I_{K1}), que exhibe rectificación interna; y se inactivan la corriente de entrada de calcio y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, restableciéndose finalmente el potencial de membrana en reposo. Los canales de K^+ de rectificación interna seguirán activos durante toda la **fase 4**, contribuyendo de forma dominante a mantener el potencial de membrana en reposo junto al intercambiador Na^+/K^+ , bomba ATP dependiente que expulsa iones Na^+ e introduce iones K^+ a la célula.

Asimismo, además de las corrientes iónicas citadas, existen otras corrientes que contribuyen al potencial de acción cardiaco, como son la corriente de potasio activada por acetilcolina (I_{KACh}), hiperpolarizante y presente sólo en miocitos auriculares; y la corriente de potasio sensible a ATP, hiperpolarizante y dependiente de las concentraciones de ATP. Cuando se activa, lo es en mayor medida en los miocitos ventriculares que en los miocitos auriculares, y durante las fases 2 y 3 del potencial de acción (Jalife et al., 2009; Oudit & Backx, 2009; Li & Dong, 2010). Esta última, objeto de estudio en la presente tesis, se describirá con mucho más detalle en el apartado 1.2.2. de este manuscrito.

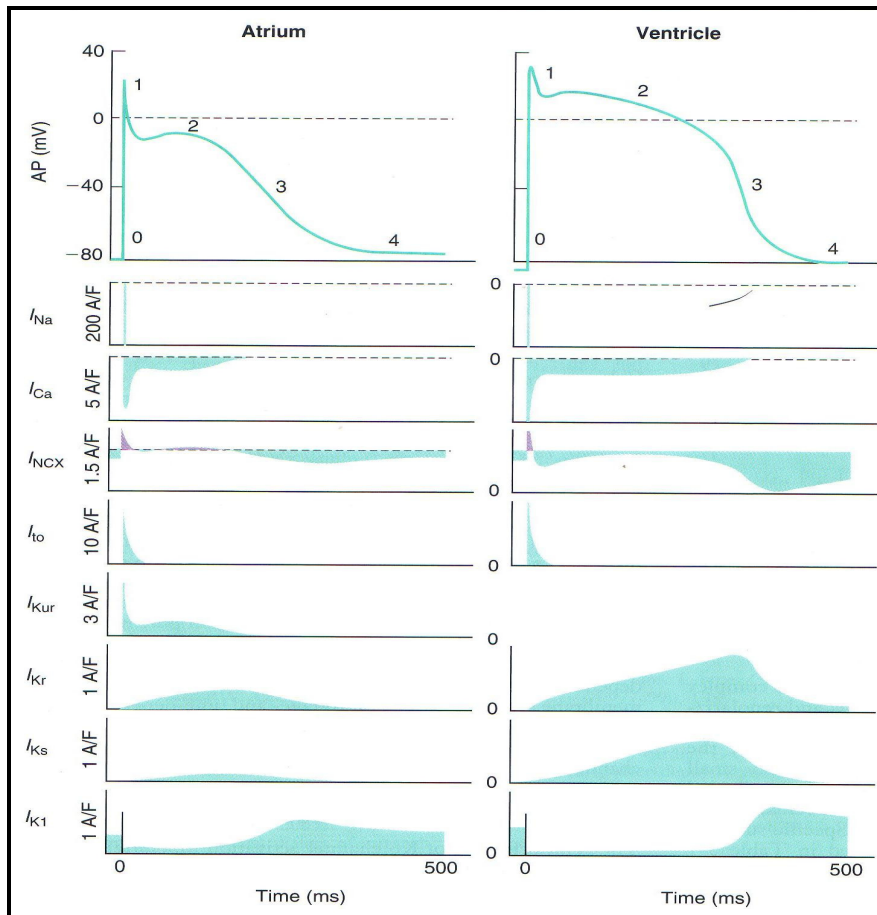


Figura 1.2. Corrientes iónicas generadoras del PA cardiaco. Diferencias entre los miocitos auriculares y ventriculares. Tomado de Oudit & Backx, 2009.

En lo que se refiere a la refractariedad, en condiciones fisiológicas, el periodo refractario es predominantemente dependiente del voltaje y termina en plena repolarización del potencial de acción. Sobre esta base, una estrategia antiarrítmica común es el uso de fármacos que prolongan la duración del potencial de acción (DPA), con la intención de prolongar la refractariedad y así reducir la probabilidad de que se produzcan reentradas. La DPA se utiliza ampliamente como una medida de la refractariedad en los estudios

relacionados con los mecanismos de la arritmogénesis, aunque, como más adelante veremos, esta correspondencia se pierde en la isquemia (Sutton et al., 2000).

1.2.1.2. Modificaciones electrofisiológicas arritmogénicas en la isquemia aguda.

Sin perjuicio de que en líneas más adelante centremos este apartado en los acontecimientos electrofisiológicos ligados al proceso isquémico miocárdico agudo, haremos unas breves consideraciones acerca de algunas modificaciones sobre las que en última instancia se asientan algunos de los citados efectos electrofisiológicos debidos a la interrupción del flujo sanguíneo coronario y que ya forman parte de los que podríamos calificar como investigaciones clásicas en el campo objeto de nuestro estudio. En tales estudios ya se correlacionó el daño miocárdico por la isquemia con los niveles de fosfatos de alta energía, asociándose un bajo nivel de ATP con una depresión en la resíntesis del mismo y un fallo en la regulación del volumen celular. Fallos que precedieron al desarrollo de un evidente daño de la membrana celular, lo que ocurrió solamente cuando el contenido tisular de ATP disminuyó a menos de 2 $\mu\text{mol/g}$ y se asoció con un marcado empeoramiento de otras funciones celulares integradas, todo lo cual es un claro signo de deterioro letal (Reimer et al., 1981). Los cambios en la concentración de ATP comienzan prematuramente. Ya a los 20 segundos aproximadamente, la respiración mitocondrial se interrumpe y se pone en marcha la glucólisis anaerobia que da lugar a una cantidad limitada de ATP; esta glucólisis además queda inhibida prontamente por el efecto depresor sobre la actividad de algunos

enzimas glucolíticos por los metabolitos que se producen, como es el caso del lactato (Jennings & Reimer, 1989). Que la oclusión de una arteria coronaria durante 40 minutos producía una lesión irreversible y muerte celular, y que periodos más breves (alrededor de veinte minutos) de oclusión podían recuperar el tejido miocárdico tras una reperfusión, fue ya clásicamente descrito (Jennings et al., 1960; Jennings et al., 1969; citados por Kloner et al., 1974).

Una alteración que acaba produciéndose en la mitocondria es la despolarización de su membrana, aunque esto no ocurre de modo inmediato y ligado a la interrupción del flujo de electrones sino ligeramente más tarde ya que todavía se produce ATP a expensas de la glucolisis. Cuando este último proceso se bloquea se produce una importante depleción de ATP y un incremento de la concentración intracelular de calcio. Por otra parte, la caída del ATP por debajo de ciertos niveles y el incremento de la concentración de protones, calcio, fosfato y acil-carnitinas de cadena larga acaba originando la activación del llamado poro de transición o megacanal, siendo este poro activado en la membrana interna de la mitocondria y por el cual la mitocondria llega a ser anormalmente permeable en el sentido de dejar salir una serie de sustancias desde el interior de la misma. Al fin, todas estas circunstancias (bloqueo en el metabolismo oxidativo, disminución del cociente ATP/ADP, etc.) acaban produciendo consecuencias como son alteraciones del metabolismo lipídico, producción de estrés oxidativo, liberación de catecolaminas, alteraciones de las concentraciones iónicas, etc. Los poros que se abren atravesando la membrana interna mitocondrial crean una situación similar a la que crean los agentes desacopladores de la fosforilación oxidativa. En

condiciones de normal oxigenación, con concentración normal de oxígeno y ATP, estos poros de transición o megacanales están inactivos, mientras que se activan en la isquemia, situación bioquímica en la que se invierte en lo que al calcio y al ATP se refiere (ver revisión de Carmeliet, 1999). Estas consecuencias serán en gran medida la base sobre la que se asientan las modificaciones electrofisiológicas propias de la isquemia.

Comentaremos someramente las alteraciones electrofisiológicas más directamente relacionadas con la aparición de arritmias que amenazan la vida, como es la fibrilación ventricular, y en las que subyacen fenómenos de reentrada (ver revisión de Carmeliet, 1999; Sutton et al., 2000; ver revisión de Billman, 2008).

En lo que se refiere a los cambios en la despolarización, encontramos que la interrupción del flujo coronario origina, en pocos minutos, una caída del potencial de membrana del cardiomiocito ventricular a valores menos negativos (de -85 mV a -60 mV) que produce un aumento de la excitabilidad en su fase inicial, seguida de una disminución de la misma, de la pendiente de la despolarización, de la conducción, y todo ello coincidente con un incremento de la concentración extracelular de potasio. Durante los primeros minutos de isquemia, en los que como acabamos de comentar la excitabilidad en la zona central de la isquemia se incrementa, el potencial umbral permanece invariable, pero se requiere menos corriente para llegar a él debido a la despolarización de la membrana. Más tarde, la excitabilidad disminuye gradualmente, principalmente debido a la inactivación del canal de Na⁺ por la despolarización. La reducción de

la excitabilidad es más pronunciada en el subepicardio que en las fibras subendocárdicas. Algunas células recuperan la excitabilidad después de 15 minutos de isquemia; esta recuperación puede ser causada por alguna hiperpolarización, como consecuencia del "lavado" de K^+ extracelular a través de la circulación colateral y/o la estimulación de la bomba Na^+-K^+ por la liberación masiva de catecolaminas y el aumento del Ca^{2+} intracelular. Después de 30 minutos, empieza una nueva fase de inexcitabilidad y es debido a un aumento secundario en la pérdida de K^+ de las células, concomitante con una caída máxima de la concentración de ATP (ver revisión de Carmeliet, 1999).

Por otra parte, en relación a la DPA y a los cambios en la refractariedad, hay que decir que aquel se acorta tras una ligera prolongación que curiosamente se acompaña de una prolongación del periodo refractario efectivo (PRE) (ver revisión de Sutton et al., 2000). Entre los 7 y 10 minutos de isquemia la DPA y la duración del PRE pueden alternar mostrando duraciones entre normales y muy cortas. La falta de respuesta completa sigue muy pronto. Después de 15-20 minutos, sin embargo, las células ubicadas en la zona central del infarto pueden recuperar temporalmente su excitabilidad. Estos cambios se correlacionan con una liberación masiva de catecolaminas, una abertura de la circulación colateral, y una pequeña disminución en la concentración de potasio extracelular. Tras unos 30 minutos, las células se despolarizan más, y la conducción se bloquea.

Se han descrito diversos mecanismos subyacentes a los cambios del potencial de reposo y del PA durante la isquemia (ver

revisión de Carmeliet, 1999). El aumento en la concentración de potasio extracelular y la existencia simultánea de una corriente hacia el interior son la principal causa de la despolarización durante la isquemia. Los posibles mecanismos implicados en la fuga hacia el interior son múltiples e implican al Na^+ , Ca^{2+} y a los canales de Cl^- e intercambiadores. La disminución en la velocidad de conducción y la amplitud del PA es causada por una caída en la entrada de Na^+ y el aumento simultáneo de corrientes hacia el exterior, provocando un efecto de cortocircuito. La conductancia al sodio disminuye secundariamente a la inactivación de los canales de Na^+ por la caída del potencial de reposo y por la acción sobre el canal de Na^+ de proteínas anfifílicas, de ácidos grasos, del estrés oxidativo y de la acidosis. La corriente de entrada de Na^+ se reduce aún más por una caída en el gradiente químico debido principalmente a un aumento en la concentración intracelular de Na^+ . La eficacia de la corriente I_{Na} en la generación del ascenso del PA se reduce aún más por el efecto de cortocircuito de las corrientes hacia el exterior, tales como I_{KATP} , la corriente de potasio activada por sodio (I_{KNa}), y a la corriente de potasio rectificadora externa (I_{KAA}).

El alargamiento transitorio del PA durante los primeros segundos de la isquemia puede ser debido en parte a: una caída en la temperatura local (>1 °C), una reducción de la corriente de la bomba electrogénica, una caída en I_{K1} , y una inhibición aguda de I_{to} . El acortamiento del PA, que sigue muy rápidamente y es más prominente, es causado por un aumento de la corriente hacia el exterior a potenciales propios del *plateau*; que se lleva por el K^+ y por el Cl^- , de los cuales el K^+ es el más importante, y son corrientes de K^+

que se activan en condiciones isquémicas ($I_{K_{ATP}}$, $I_{K_{Na}}$, y $I_{K_{AA}}$). Éstas conllevan grandes corrientes independientes del tiempo y muestran rectificación hacia al exterior en presencia de una concentración intracelular de K^+ normal o moderadamente elevada. De este modo, su efecto será más marcado en los niveles despolarizados, es decir, en la meseta del potencial de acción. Las corrientes de K^+ activadas bajo condiciones fisiológicas, están más bien inhibidas en las condiciones isquémicas. Los cambios en las corrientes de entrada son de menor importancia en el acortamiento del PA. En relación al acortamiento del PA en la zona “límitrofe”, se halla ligado a la corriente de lesión que se establece entre la zona isquémica y la sana. En contraste con el efecto sobre la DPA, el PRE se prolonga en la zona isquémica. En la zona fronteriza, tanto el PRE como la DPA se acortan. La prolongación del PRE es causada por el enlentecimiento de la recuperación desde la inactivación de canales de Na^+ secundaria a la despolarización, al bloqueo de los canales de Na^+ por la acidosis, a las acil-carnitinas de cadena larga, a la lisofosfatidilcolina, a los radicales del oxígeno y al efecto de cortocircuito de la apertura de canales de K^+ y Cl^- (ver revisión de Carmeliet, 1999). Datos aportados por Weiss et al. (1992), demostraron que existía una relación temporal entre el detrimento de la duración del PA y el acumulo de K^+ extracelular en tabiques interventriculares aislados de conejo (figura 1.3.) (ver revisión de Billman, 2008).

El que en la zona “límitrofe” tanto la duración del potencial de acción como la refractariedad se acorten es debido a la existencia de la corriente de lesión. Aunque los canales de Na^+ pueden ser inhibidos ligeramente por una pequeña despolarización, el aumento en la

conductancia en reposo está ausente. La duración total del PRE es corta y la recuperación después de la repolarización es rápida. Por lo tanto, existe una marcada dispersión en el PRE sobre la zona fronteriza, condición que favorece la aparición de arritmias de reentrada. La estimulación simpática aumenta este tipo de dispersión (ver revisión de Carmeliet, 1999).

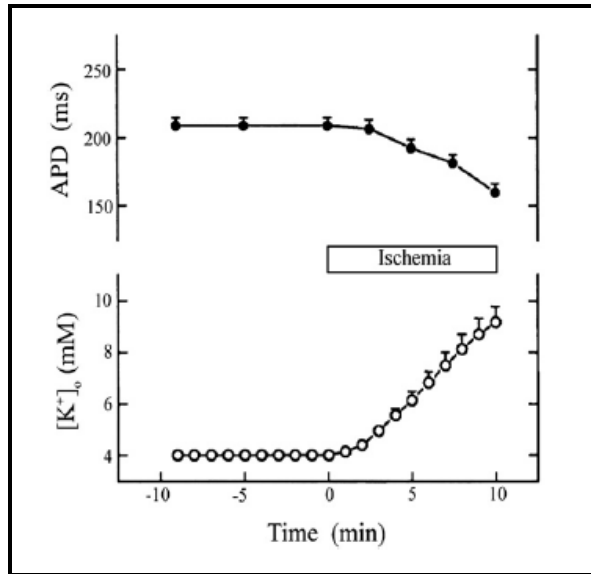


Figura 1.3. Relación temporal entre el acortamiento del PA y la salida de K⁺ durante la isquemia global. De Weiss et al., 1992; tomado de Billman, 2008.

La velocidad de conducción está determinada por las propiedades activas de la célula (amplitud y velocidad de ascenso del PA) y de una serie de propiedades como son la resistencia de la membrana celular, la resistencia longitudinal de la célula, la resistencia del compartimento extracelular, y, a mayor escala, la arquitectura tisular. Todas estas propiedades cambian precozmente durante la isquemia y afectan negativamente a la velocidad de

conducción. La disminución en la amplitud y en la rapidez del aumento del PA son, junto con el aumento de la conductancia de la membrana celular en reposo y el aumento de la resistencia extracelular secundaria a una interrupción del flujo sanguíneo, los factores más importantes. En una etapa del proceso isquémico de más de 15 minutos, aumenta la resistencia celular longitudinal dramáticamente, resultando en una marcada caída de la conducción. Este cambio se debe al cierre de las uniones *gap*, después de la subida conjunta en las concentraciones intracelulares de H^+ y Ca^{2+} , el efecto de las acilcarnitinas de cadena larga, y la caída en la concentración del ATP. La existencia de potenciales a través de las uniones en hendidura puede causar la inactivación adicional de la conductancia en estas uniones. Las modificaciones en las uniones *gap* son heterogéneas en la isquemia y por lo tanto representan un factor importante en la génesis de las arritmias (ver revisión de Carmeliet, 1999).

Los anteriores cambios no ocurren de manera uniforme en el miocardio infartado, y la heterogeneidad es especialmente pronunciada en la zona "límitrofe" (entre la zona sana y la zona isquémica). La dispersión de la refractariedad y otras propiedades fisiológicas ya existe en condiciones normales. De hecho, hay gradientes en la duración del potencial de acción entre el epicardio y el endocardio, entre el vértice, la pared libre y el tabique, y entre el ventrículo derecho y el izquierdo. Sabemos que el miocardio es un sincitio funcional, pero no es absolutamente homogéneo desde el punto de vista electrofisiológico. Existe falta de continuidad y falta de homogeneidad en el mismo, tanto a nivel estructural, como desde el punto de vista de las propiedades eléctricas de la membrana, lo que

se agrava ostensiblemente en situaciones patológicas, como es el caso de la isquemia. Este incremento de heterogeneidad es responsable de la aparición de bloqueos en la conducción, dispersión espacial de la repolarización, etc. (ver revisión de Kléber & Rudy, 2004), lo que a su vez facilita la aparición del fenómeno de la reentrada y las arritmias ligadas al mismo. La disociación entre la DPA y el PRE está menos presente o ausente en la zona limítrofe del infarto; en esta región ambos se acortan. A ambos lados de esta zona limítrofe, la excitabilidad puede estar aumentada. El umbral está reducido en el lado isquémico debido a un aumento en la concentración de potasio extracelular y en el lado no isquémico debido a la despolarización causada por la corriente de lesión. La máxima corriente de lesión se obtiene cuando la activación de la zona isquémica se produce en el momento que la zona normal ya está repolarizada (ver revisión de Carmeliet, 1999).

En relación a las modificaciones electrofisiológicas producidas por la isquemia, nuestro grupo ha relatado que, en un modelo de corazón aislado y perfundido de conejo, y por tanto no sometido a influencias nerviosas extrínsecas ni humorales, la oclusión coronaria originó un incremento de la refractariedad miocárdica. Tal resultado se obtuvo de modo indirecto a través del análisis de la frecuencia dominante (FD) durante la fibrilación ventricular inducida, sin la interrupción de la perfusión global del corazón sometido a isquemia regional aguda (Such-Miquel et al., 2007; Such et al., 2013). Como ha sido publicado, hay una estrecha relación entre la frecuencia dominante durante la fibrilación y la refractariedad (para revisión ver Chorro et al., 2000a). También el incremento de la heterogeneidad

electrofisiológica producido por la isquemia es un hecho clásicamente establecido y que nosotros hemos constatado en el modelo de corazón aislado de conejo al que anteriormente hemos aludido (Parra et al., 2009). Asimismo, analizada la heterogeneidad de la frecuencia dominante durante la fibrilación ventricular durante la isquemia global, Caldwell et al. (2007) encontraron heterogeneidades en el corazón, entre los ventrículos, en distintos parámetros electrofisiológicos, como son la velocidad de conducción y el periodo refractario efectivo; heterogeneidad entre los ventrículos que ya había sido descrita para la frecuencia durante la fibrilación por Wu et al. (2006), citados por Caldwell et al. (2007).

Las alteraciones en el patrón de activación miocárdica durante la fibrilación ventricular pueden estar ligadas a modificaciones electrofisiológicas que afectan a la duración del potencial de acción, al potencial de acción monofásico y/o a la refractariedad (para revisión ver Chorro et al., 2000c). La isquemia aguda, como acabamos de describir, modifica diversas propiedades electrofisiológicas, tales como la refractariedad miocárdica y la heterogeneidad electrofisiológica, que condicionan el proceso de activación miocárdica. En este sentido, Massé et al. (2009) observaron, en un estudio realizado en corazones humanos aislados, perfundidos y a los que se les provocó fibrilación ventricular, que la isquemia miocárdica global conllevaba progresivos cambios espacio-temporales en el patrón de activación eléctrica del epicardio y el endocardio; y que probablemente eran el resultado de una complicada interacción entre la velocidad de conducción, excitabilidad, refractariedad y longitud de onda. Es, efectivamente, a través de tales modificaciones cómo la isquemia aguda implica una

alteración de los patrones de activación del miocardio durante la fibrilación ventricular.

La traducción en el electrocardiograma (ECG) de los efectos electrofisiológicos es la siguiente: a) Una depresión inicial del segmento T-Q como expresión de la disminución del potencial de reposo en zona isquémica (registrado el ECG en ciertas condiciones); b) Una elevación del segmento S-T; c) Ensanchamiento del complejo QRS y retraso de la deflexión intrínseca. Una desviación del segmento S-T se produce tras unos 5 minutos por la más rápida despolarización, porque a su vez el potencial de acción se acorta más en el miocardio isquémico. Más tarde, cuando la activación en la región isquémica se retrasa seriamente, el segmento S-T se eleva marcadamente y la onda T se invierte de forma pronunciada. En la zona central necrosada el ECG muestra morfologías monofásicas. La activación local se recupera transitoriamente, lo que a veces produce alternancia de la onda T, tras entre 8 y 15 minutos de isquemia (ver revisión de Carmeliet, 1999).

1.2.2. El canal de potasio ATP sensible miocárdico y su comportamiento en las modificaciones fisiopatológicas debidas a la isquemia aguda.

Como ya ha sido citado en el anterior apartado, existen diferentes canales de potasio que contribuyen a la repolarización en diferentes fases del PA cardiaco. La existencia de los canales K_{ATP} se ha puesto de manifiesto en diferentes partes anatómicas del organismo. Fueron descritos, en primer lugar, en el sarcolema de

miocitos cardiacos (Noma, 1983). Posteriormente, también fueron descritos en páncreas (Ashcroft et al., 1984; citados por Cogolludo, 2005), en músculo esquelético (Spruce et al., 1985; citados por Cogolludo, 2005), en cerebro (Ashford et al., 1988; citados por Cogolludo, 2005) y en músculo liso (Standen et al., 1989; citados por Cogolludo, 2005). A continuación expondremos los aspectos más destacables sobre la estructura de estos canales, su modulación y regulación, y las controversias actuales sobre su papel en la protección miocárdica.

1.2.2.1. Estructura molecular de los canales K_{ATP} miocárdicos.

Los canales K_{ATP} están compuestos de subunidades del receptor de las sulfonilureas (SURx) y de una proteína, $K_{ir}6.x$, perteneciente a la superfamilia de los canales de potasio de rectificación interna (K_{ir}), junto a otros componentes adicionales. $K_{ir}6.x$ consiste en una disposición tetramérica de subunidades, cada una compuesta de dos hélices transmembrana (M1 y M2), una región de formación de poros y un N-terminal (incluyendo la hélice anfipática corredera o “*Slide helix*”) y un C-terminal citoplasmáticos. Las subunidades SURx contienen 17 regiones transmembrana agrupadas en 3 dominios transmembrana (TMD0, TDM1 y TDM2), compuestos por cinco, seis y seis segmentos transmembrana, respectivamente. El TMD0 y el enlazador L0 interactúan con $K_{ir}6.x$ y modulan su activación periódica. Cada unidad SURx tiene dos dominios de unión de nucleótidos (NBD) entre TMD1 y TMD2 (NBD1) y en el extremo -COOH a continuación de TMD2 (NBD2) (figura 1.4. A). Un canal K_{ATP} funcional es un hetero-

octamero (figura 1.4. B) formado por cuatro subunidades $K_{ir}6.x$ y cuatro subunidades SURx (ver revisión de Flagg et al., 2010).

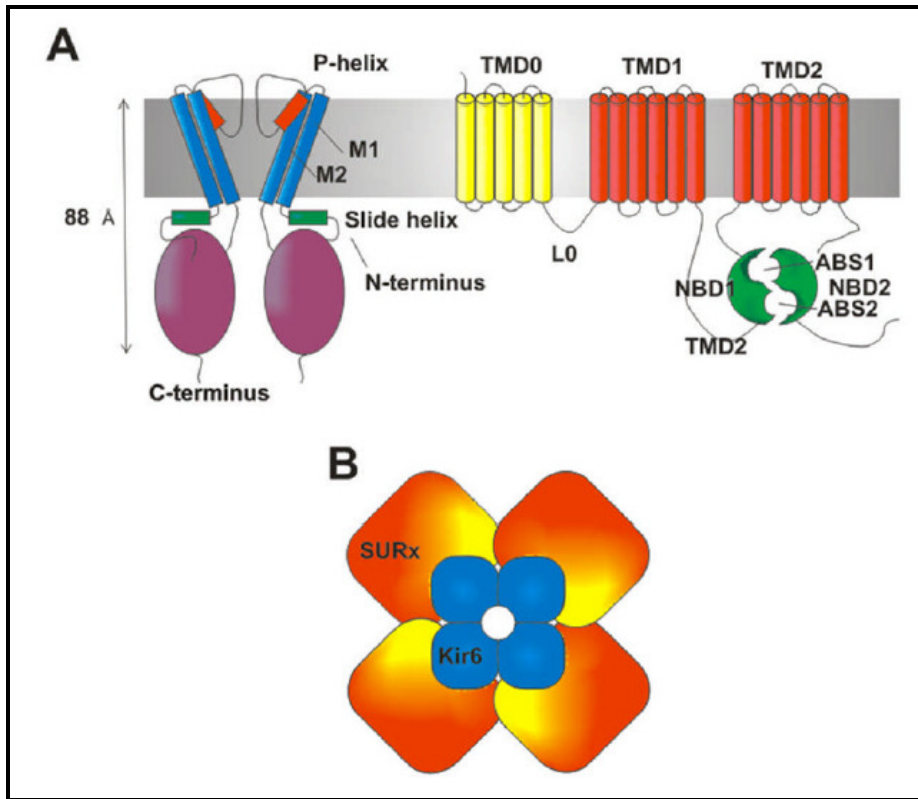


Figura 1.4. (A) Componentes moleculares de los canales K_{ATP} . (B) Estructura octamérica de las subunidades $K_{ir}6.x$ y SURx del canal K_{ATP} . Tomado de Flagg et al., 2010.

La subunidad SURx, que regula la actividad de los canales K_{ATP} , presenta dos subtipos, SUR1 y SUR2, que a su vez se clasifican en dos isoformas SUR2A y SUR2B. Las subunidades SUR2A y SUR2B difieren sólo en los 42 aminoácidos del extremo carboxilo-terminal (C42) (ver revisión de Hibino et al., 2010). Existen dos subtipos de subunidades K_{ir} , que forman el poro de los canales K_{ATP} : $K_{ir}6.1$ y $K_{ir}6.2$. Se prevé, en general, la misma estructura de poros para las dos

subunidades $K_{ir}6.1$ y $K_{ir}6.2$. Sin embargo, presentan distintas conductancias de canal único (~ 35 y ~ 80 pS, respectivamente, en soluciones de K^+ 150 mM), conferidas por los residuos específicos en las regiones transmembrana M1 y M2 (ver revisión de Flagg et al., 2010).

Teniendo en cuenta que cualquier par de los tetrámeros SURx: $K_{ir}6.x$ se pueden co-ensamblar cuando se expresan de manera heteróloga, y que incluso dentro de un único canal pueden coexistir más de un isotipo SURx o un isotipo $K_{ir}6.x$, la determinación de la composición molecular del canal en diferentes tejidos ha sido un reto. Las diferentes combinaciones de subunidades SURx y $K_{ir}6.x$ dan lugar a los distintos tipos de canales K_{ATP} en diferentes localizaciones anatómicas (ver revisiones de Flagg et al., 2010; Hibino et al., 2010; y Li & Dong, 2010) (figura 1.5.).

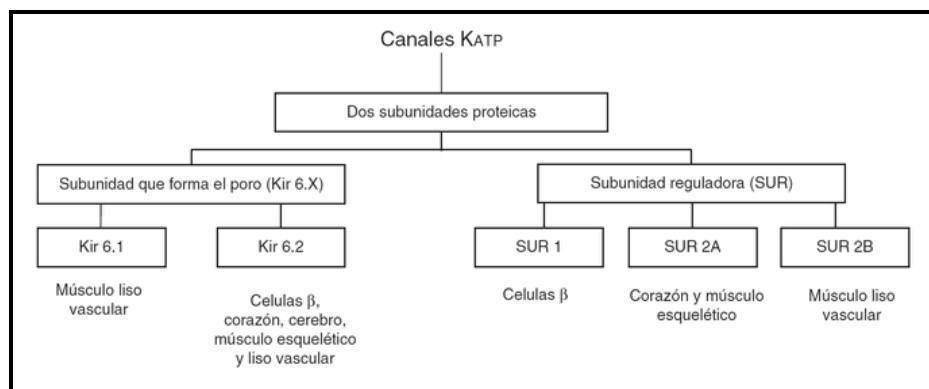


Figura 1.5. Composición molecular de los canales K_{ATP} en diferentes localizaciones anatómicas. Tomado de Tamayo, 2007.

SUR1 se encuentra de forma predominante en las células β del páncreas y en algunos tipos de neuronas, mientras que la subunidad

SUR2A se encuentra en el músculo cardíaco y esquelético, y la subunidad SUR2B en el músculo liso. $K_{ir6.2}$ se expresa predominantemente en las células β del páncreas, corazón, cerebro y músculo esquelético. Se ha postulado que tanto $K_{ir6.1}$ como $K_{ir6.2}$ se expresan en el músculo liso (ver revisión de Tamayo, 2007).

Concretamente, a nivel del músculo cardíaco, se pueden expresar varias variantes de unión de subunidades SUR1 y SUR2, así como de subunidades $K_{ir6.1}$ y $K_{ir6.2}$, existiendo diferencias estructurales entre los canales K_{ATP} auriculares y los ventriculares. Además, ellos se identifican por su ubicación dentro de la célula pudiendo ser del sarcolema ($sarck_{ATP}$) o de la mitocondria ($mitoK_{ATP}$). Varios estudios apoyan la conclusión de que los canales $sarck_{ATP}$ en los miocitos ventriculares se componen principalmente de subunidades SUR2A y $K_{ir6.2}$, formando un complejo heterooctamérico compuesto por 4 subunidades $K_{ir6.2}$, que forman el poro del canal, y 4 subunidades moduladores SUR2A. Sin embargo, son relativamente pocos los que han examinado las propiedades biofísicas y farmacológicas del canal $sarck_{ATP}$ en los miocitos auriculares. Estos estudios han proporcionando una evidencia inequívoca de una función esencial de la subunidad SUR1 en el canal $sarck_{ATP}$ auricular. La implicación funcional de esta disparidad estructural de los canales K_{ATP} auriculares y ventriculares no está clara, pero posiblemente, los canales compuestos por subunidades SUR1 son necesarios para una función específica de la aurícula, tal como el acoplamiento del estiramiento auricular con la secreción de péptido natriurético auricular (ver revisión de Flagg et al., 2010).

Por otro lado, también es necesario destacar la importancia de los canales de K^+ sensibles al ATP mitocondriales, implicados de manera significativa en la fisiopatología cardíaca. Los canales mito K_{ATP} fueron descubiertos por primera vez en hígado de rata, encontrándose en la membrana interna de la mitocondria (Inoue et al., 1991). Sin embargo, sigue habiendo importantes controversias en la identidad molecular de los canales mito K_{ATP} . Estos canales pueden estar compuestos de subunidades $K_{i,6.x}$ y SURx. Empleando un anticuerpo frente a $K_{i,6.1}$ marcado y unido a una proteína de 51-kDa en la fracción de membrana mitocondrial, se ha sugerido que la subunidad $K_{i,6.1}$ es un posible componente del canal mito K_{ATP} . Otros estudios han sugerido que las subunidades $K_{i,6.1}$, $K_{i,6.2}$, y SUR2A están presentes en las mitocondrias del corazón y del cerebro (ver revisión de Hibino et al., 2010).

1.2.2.2. Actividad de los canales K_{ATP} miocárdicos y su modulación.

La regulación de los canales K_{ATP} es bastante compleja y se produce a varios niveles por fosfolípidos de la membrana (PIP_2), ácidos grasos (LC-acil-CoA), protein-quinasas (PKA y PKC), pH, y los nucleótidos intracelulares (ATP, MgADP). El papel del pH intracelular, de los fosfolípidos de membrana, de la fosforilación del canal y del acil-CoA en la regulación de los canales K_{ATP} nativos en el músculo cardíaco son menos conocidos (ver revisión de Flagg et al., 2010). Por otra parte, la actividad desempeñada por los canales K_{ATP} deriva de su habilidad para acoplar el metabolismo celular a la actividad eléctrica, detectando cambios en el citosol de los niveles de ATP, y de

adenosina difosfato de magnesio (Mg-ADP), funcionando el ATP como un bloqueador del canal, y el Mg-ADP como un activador o promotor de su apertura (ver revisión de Li & Dong, 2010).

Fisiológicamente, el ATP intracelular (ATP_i) es el regulador principal del canal K_{ATP} . Este compuesto de alta energía se une a la subunidad $K_{ir}6.2$ (cuatro moléculas de ATP podrían unirse a un canal K_{ATP}) y puede ejercer dos funciones distintas: 1) cierra el canal, y 2) mantiene la actividad del canal en la presencia de Mg^{2+} . Por otro lado, el ADP interacciona con la subunidad SUR2A. Los nucleótidos difosfato, como el ADP, son esenciales para la apertura fisiológica de los canales K_{ATP} , que de otro modo se encuentran cerrados de forma permanente por su marcada sensibilidad al ATP_i . Se ha demostrado que el ADP aumenta la actividad del canal K_{ATP} en contra de la inhibición de la apertura del canal inducida por el ATP_i . Sin embargo, los efectos positivos del ADP requieren la presencia de Mg^{2+} ; en ausencia de Mg^{2+} aumenta el efecto inhibitorio del ATP_i (ver revisión de Hibino et al., 2010). Además, se ha descrito que la actividad fisiológica más relevante del canal K_{ATP} en la membrana cardíaca se limita a un porcentaje muy pequeño de la posible corriente $I_{K_{ATP}}$ celular, y por lo tanto, el ATP_i no tendría que disminuir demasiado previamente a la apertura de los canales K_{ATP} (ver revisión de Billman, 2008). Seguramente, la concentración de ATP nunca cae por debajo de los niveles milimolares en un tejido vivo y el efecto activador de la unión de nucleótidos difosfato de magnesio será importante fisiológicamente, por lo que probablemente es más adecuado considerar tanto la caída del ATP y acompañado al aumento de ADP como los principales parámetros de regulación fisiológica. Estos

canales se encuentran entre los canales iónicos más densamente poblados del miocardio y la apertura de aproximadamente del 1% de la cantidad total de canales K_{ATP} del sarcolema puede acortar significativamente el PA cardíaco y una reducción significativa de la contractilidad. Modelos informáticos sobre el potencial de acción, en los que la actividad del canal K_{ATP} es controlada solamente por la proporción ATP/ADP, indican que esto podía ocurrir a unos niveles milimolares de ATP y a unos niveles micromolares de ADP en corazones con canales K_{ATP} normales, y que en los corazones que expresan transgenes insensibles al ATP, debe ocurrir un acortamiento dramático del potencial de acción a cualquier nivel fisiológico de ATP. Así pues, parece que otros factores están actuando para mantener los canales de K_{ATP} cardíacos cerrados bajo condiciones normales con el fin de evitar el acortamiento del potencial de acción y mantener la contractilidad (ver revisión de Flagg et al., 2010).

Los canales K_{ATP} cardíacos se encuentran cerrados a las concentraciones intracelulares fisiológicas de ATP y se activan por un descenso del cociente ATP/ADP intracelular, como ocurre durante la isquemia miocárdica (para revisión ver Vajda et al., 2007). Anteriormente se ha descrito que la concentración de potasio extracelular se eleva rápidamente durante la isquemia miocárdica, pudiendo contribuir a la despolarización del tejido circundante, la disminución de la duración del potencial de acción y la falta de uniformidad de la repolarización (periodo refractario), y en última instancia a la inducción de arritmias malignas. Asimismo, han sido propuestos varios mecanismos para explicar el aumento de la salida de potasio durante la isquemia miocárdica. Sin embargo, cada vez

existe una mayor evidencia científica de que esta acumulación extracelular de potasio inducida por la isquemia y consiguientemente la reducción del PA, es el resultado, en gran medida, de la apertura de canales K_{ATP} (ver revisiones de Billman, 1994; y Billman, 2008). En este sentido, Trube y Hescheler (1984), citados por Billman (2008), fueron los primeros en registrar la actividad de un canal K_{ATP} en 1984. Previamente se había demostrado que la reducción de ATP celular inducida por la exposición al cianuro provocaba una corriente de salida de potasio (Noma, 1983). Estos mismos autores demostraron que el canal K_{ATP} solamente se activaba cuando la concentración de ATP era baja, siendo a concentraciones de entre 20-100 μM cuando se producía la mitad de la máxima supresión de la apertura del canal. En este sentido, los canales sarck_{ATP} se abren en condiciones de estrés oxidativo para producir una corriente rectificadora interna de potasio, típicamente observada en los primeros 10 minutos de isquemia (ver revisión de Brown & O'Rourke, 2010). Asimismo, la compartimentación funcional del ATP también puede contribuir a la activación del canal K_{ATP} durante la isquemia, haciendo que se requieran sólo cambios modestos en el ATP celular para inducir importantes cambios en las propiedades eléctricas cardíacas (ver revisión de Billman, 1994).

Se han propuesto diferentes modelos que explican la apertura y el cierre del canal de potasio SUR2x/Kir6.2 cardíaco. Un de ellos es el modelo alostérico (figura 1.6.). En este caso, se asume lo siguiente: 1) un canal SUR2x/K_{ir}6.2 tiene una estructura hetero-octamérica compuesta por cuatro subunidades SUR2x y cuatro subunidades K_{ir}6.2; 2) cada SUR2x tiene un receptor (hendidura) para un ligando

(círculo relleno); 3) SUR2x tiene dos conformaciones diferentes que son capaces de abrir (conformación R) o no (conformación T) el poro del canal formado a partir de subunidades Kir6.2; 4) las conformaciones T y R están en equilibrio, determinado por la constante L alostérica (donde L es la proporción de las conformaciones R y T en ausencia de cualquier ligando); 5) la estructura del receptor con respecto al ligando es distinta en las conformaciones T y R, y tiene mayor afinidad por el ligando en la conformación R en lugar de la T; y 6) como resultado, el ligando desplaza el equilibrio T-R hacia la conformación R. El ligando puede ser el nicorandilo, el ATP o el ADP. En el caso de nicorandilo, la hendidura representa el sitio del receptor de drogas. Para el ATP y el ADP, la hendidura corresponde a los dominios de unión de nucleótidos NBD1 y/o NBD2 (ver revisión de Hibino et al., 2010).

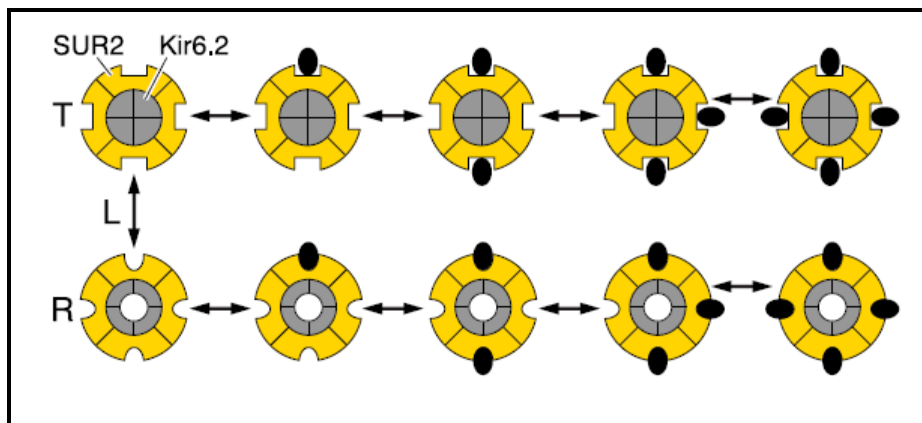


Figura 1.6. Modelo alostérico de apertura y cierre del canal de potasio SUR2x/Kir6.2 cardiaco. De Yamada et al., 2004; tomado de Hibino et al., 2010.

Otro modelo que pretende explicar la apertura y el cierre del canal de potasio SUR2x/Kir6.2 cardiaco está basado en el hipotético

cambio conformacional de SUR2x inducido por la dimerización del dominio de unión de nucleótidos (figura 1.7.). En este modelo, SUR2x interactúa con Kir6.2 a través del dominio transmembrana 0 (TMD0) y L0, un “enlazador” citoplasmático entre TMD0 y TMD1. NBD1 y NBD2 se encuentran uno junto al otro y el poro del canal formado por Kir6.2 permanece abierto. El ATP intracelular (ATP_i) induce la dimerización de NBD1 y NBD2, y por lo tanto un cambio conformacional de TMD1 y TMD2. Este cambio conformacional se transfiere a través de TMD0-L0 hasta Kir6.2 (flechas negras), lo que resulta en el cierre del poro del canal formado por Kir6.2. La conformación de SUR2x con y sin el dímero NBD podría considerarse equivalente a las conformaciones T y R, respectivamente, descritas anteriormente en el modelo alostérico (ver revisión de Hibino et al., 2010).

Además de la inhibición por el ATP intracelular (ATP_i), los canales K_{ATP} cardiacos son la diana de dos clases principales de compuestos terapéuticos, las sulfonilureas y los abridores del canal K_{ATP}. Todos estos compuestos afectan a los canales K_{ATP} a través de su acción sobre la subunidad SURx, y presentan distinta sensibilidad según el tipo de tejido. Estas diferencias se atribuyen a los subtipos SURx expresados en cada tejido, es decir, SUR1 en páncreas, SUR2A a nivel cardiaco, y SUR2B en músculo liso. La co-expresión de Kir6.2 con la subunidad SURx apropiada puede generar una conductancia del canal K_{ATP} con las propiedades farmacológicas observadas en cada tejido nativo. Asimismo, en condiciones fisiológicas, un número de factores adicionales están involucrados en la acción de estos fármacos. En este sentido, se ha podido demostrar que la presencia de nucleótidos intracelulares puede afectar en la

acción de las sulfonilureas y de los abridores del canal K_{ATP} en las subunidades SURx del canal K_{ATP} (ver revisión de Hibino et al., 2010).

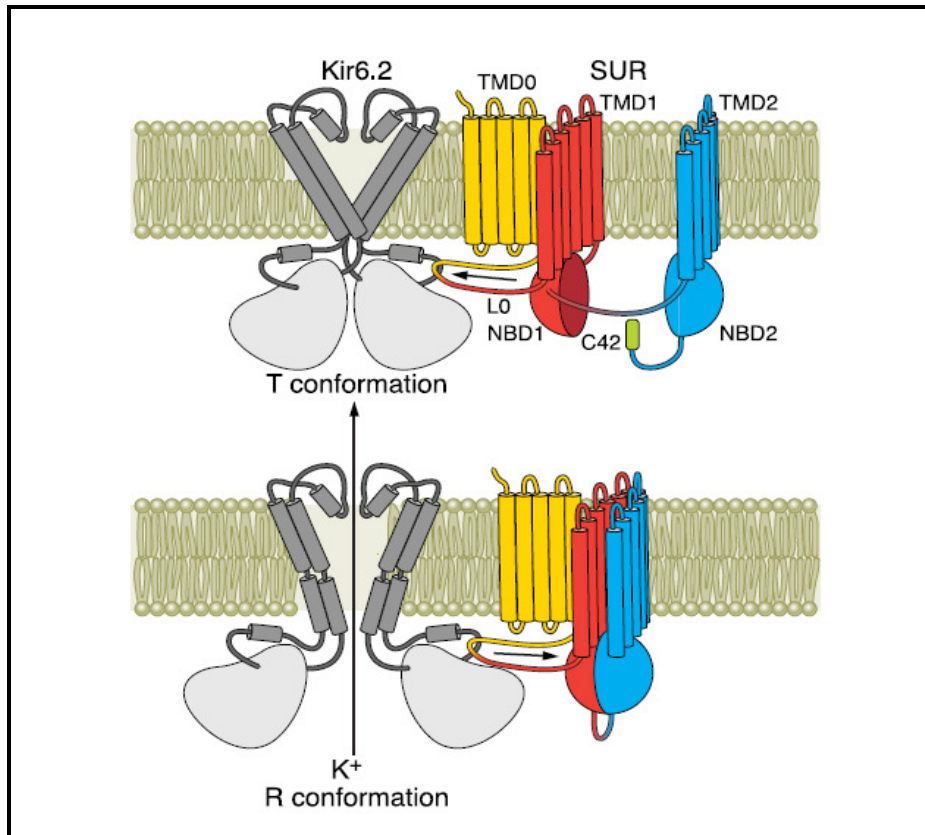


Figura 1.7. Modelo de apertura y cierre del canal de potasio SUR2x/Kir6.2 cardiaco basado en el cambio conformacional de la subunidad SUR2x. C42 hace referencia a los últimos 42 residuos en el extremo COOH de SUR2B, que se encuentran en la interfaz entre el dímero NBD. De Yamada et al., 2004; tomado de Hibino et al., 2010.

1.2.2.3. Controversias en relación al papel de los canales K_{ATP} miocárdicos.

Como ya se ha descrito anteriormente, los canales K_{ATP} actúan como sensores metabólicos únicos, participando en el acoplamiento

entre el estado metabólico celular y el potencial de membrana celular (ver revisión de Li & Dong, 2010). Sin embargo, el papel que tienen los canales K_{ATP} de membrana celular en la protección miocárdica permanece relativamente poco investigado hasta la fecha (ver revisión de Powers et al., 2008). Asimismo, existe un gran número de auténticas controversias al respecto de si el efecto protector sobre el cardiomiocito isquémico se debe a la apertura o al cierre de los citados canales.

1.2.2.3.1. Efecto protector sobre el cardiomiocito isquémico debido a la apertura de los canales K_{ATP} .

En relación a los autores que defienden que la apertura de dichos canales ejerce un efecto protector sobre el cardiomiocito isquémico, se ha demostrado que la corriente $I_{K_{ATP}}$ desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cardiaca en condiciones de estrés, así como en la isquemia-reperfusión miocárdica y durante la hipoxia, mediando en los cambios electrofisiológicos inducidos por la isquemia y en el efecto cardioprotector del preconditionamiento. La activación de la corriente $I_{K_{ATP}}$ acorta la duración del potencial de acción cardiaco por la aceleración de la repolarización durante la fase 3, reduce la entrada de calcio (evitando de este modo la sobrecarga cardiaca de calcio), preserva los niveles de ATP (efecto ahorrador de energía) e incrementa la supervivencia celular durante la isquemia miocárdica (ver revisiones de Powers et al., 2008; y Li & Dong, 2010). Utilizando fármacos abridores del canal sarc K_{ATP} en la isquemia, se observó una mejoría en la preservación del ATP y de la energía almacenada en

forma de fosfato de creatina (McPherson et al., 1993) y diversos efectos anti-isquémicos por acortamiento del potencial de acción (Grover & Garlid, 2000).

La acción cardioprotectora de la activación de los canales K_{ATP} durante la isquemia ha sido descrita en diversos modelos experimentales “in vivo”, relacionándose con una reducción de la duración del potencial de acción y una depresión del proceso contráctil. Así, Lederer et al. (1989) ya observaron que el aumento de la conductancia de los canales K_{ATP} debido a un completo “bloqueo metabólico” parecía ser el principal mecanismo responsable del acortamiento en la duración del PA, de la disminución de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y, consecuentemente, del prematuro fallo contráctil. El efecto protector se explica sobre la base de que al verse reducida la entrada de Ca^{2+} , las reservas de energía que de otro modo serían utilizadas por la célula para la contracción, serían preservadas y la sobrecarga de Ca^{2+} se reducirá al mínimo. Aunque esta “estrategia” cardioprotectora es autolimitada, ya que si muchos miocitos detienen la contracción, el corazón deja de bombear y el animal muere, parece razonable la idea que tenga lugar una protección temporal de un pequeño número de células, o de una región del corazón, contra los daños de la sobrecarga de Ca^{2+} durante la isquemia (ver revisión de Zhang et al., 2010). Debido a que la sobrecarga de calcio puede conducir a la muerte celular por necrosis y apoptosis, la activación de los canales $sarck_{ATP}$ puede ser un mecanismo citoprotector al disminuir el grado de contractura de los miofilamentos y mitigar la sobrecarga de calcio mitocondrial. Varias líneas de evidencia defienden el papel fisiológico que tiene la

expresión de canales sarcK_{ATP} funcionales en la tasa de adaptación de la excitabilidad de la membrana miocárdica, con implicaciones en la optimización del consumo energético cardíaco y la consiguiente cardioprotección en condiciones de estrés metabólico grave (Zhu et al., 2011), y/o la apertura de los mismos en la supervivencia celular durante el estrés oxidativo y en la atenuación de la muerte celular durante la isquemia (ver revisión de Brown & O'Rourke, 2010).

Por otra parte, la actividad del canal de K_{ATP} se ha implicado en el mecanismo endógeno, conocido como preconditionamiento isquémico, por el cual la exposición del corazón a breves periodos de isquemia precedidos de un insulto isquémico sostenido, conduce a una reducción significativa en el tamaño del infarto posterior. Análogo al preconditionamiento isquémico, la activación farmacológica de la canal K_{ATP} parece tener capacidades cardioprotectoras en las células individuales, así como en animal intacto y en los corazones humanos sometidos a daño isquémico (ver revisión de Kane et al., 2005). En este sentido, Gross y Auchampach (1992) propusieron por primera vez que la apertura de los canales K_{ATP} estaba implicada en los efectos protectores del preconditionamiento y que los agonistas de dicho canal simulaban dicho preconditionamiento, mientras que los bloqueadores de los canales K_{ATP} eliminaban la función protectora durante la isquemia. También ha sido documentado que los agonistas de los canales K_{ATP} preservan el rendimiento mecánico durante la reperfusión, mientras que los antagonistas de los canales pueden empeorar la disfunción mecánica bajo estas condiciones (ver revisión de Billman, 1994). Unos años más tarde se planteó que la apertura farmacológica de los canales K_{ATP} del sarcolema permitía la salida de

K^+ desde el miocito y proporcionaba cardioprotección durante la isquemia-reperfusión (Suzuki et al., 2002; Gross & Peart, 2003), contrastando con planteamientos anteriores que sugerían que el canal K_{ATP} mitocondrial era el que mediaba en la cardioprotección inducida por el preconditionamiento (Garlid et al., 1997; Gross & Fryer, 1999). Aunque exista un consenso general de que los canales K_{ATP} juegan un papel clave en el desencadenamiento del preconditionamiento isquémico, ya se trate de los canales K_{ATP} del sarcolema o de la mitocondria (Yang et al., 2009; ver revisión de Hibino et al., 2010), para otros autores, la existencia de canales de mito K_{ATP} y el papel de los canales sarc K_{ATP} *versus* los canales mito K_{ATP} en el preconditionamiento no está claro en absoluto (ver revisiones de Brown & O'Rourke, 2010; y Zang et al., 2010).

Es interesante mencionar algunos trabajos en los que se ha querido evaluar el efecto simultáneo de la apertura del canal K_{ATP} mitocondrial y de la inhibición del citado canal a nivel del sarcolema (Gonca & Bozdogan, 2010). Estos autores observaron que la apertura selectiva del canal K_{ATP} mitocondrial (con diazóxido) y el bloqueo selectivo del canal K_{ATP} del sarcolema (con HMR 1098) ejerció efectos antiarrítmicos protectores. Asimismo, produjo un efecto protector antiarrítmico el uso simultáneo de HMR 1098 y de un abridor no selectivo del canal sarcolémico y mitocondrial (pinacidilo), demostrando que el efecto antiarrítmico de pinacidilo no dependía de la apertura del canal sarc K_{ATP} .

Otros trabajos han descrito que, bajo ciertas condiciones, la activación de los canales de potasio puede tener propiedades

antiarrítmicas, en particular contra las arritmias que resultan de anomalías en la repolarización. En este sentido, han sido atribuidas diversas propiedades antiarrítmicas a los agonistas de los canales K_{ATP} en modelos experimentales no-isquémicos, en los que las arritmias que se producen como resultado de post-despolarizaciones tempranas (oscilaciones de potencial de membrana que se producen durante la fase 3 del potencial de acción cardíaco) dependen del retraso en la repolarización y pueden ser prevenidas por un activador de los canales K_{ATP} (ver revisión de Billman, 1994).

1.2.2.3.2. Efecto protector sobre el cardiomiocito isquémico debido al cierre de los canales K_{ATP} .

Contrariamente a lo anteriormente expuesto, hay autores que defienden que la apertura del canal K_{ATP} ejerce un efecto deletéreo durante la isquemia (Di Diego & Antzelevitch, 1993; ver revisiones de Billman, 2008; y Flagg et al., 2010).

En este sentido, en condiciones normales, las células ventriculares no muestran despolarización espontánea. Sin embargo, el incremento del potasio extracelular durante la isquemia promueve la despolarización del tejido circundante a las regiones isquémicas, produciendo perturbación de la actividad cardíaca eléctrica y siendo una causa potencial del inicio de impulsos prematuros ventriculares. Además, el factor que más contribuye a la FV, particularmente durante la isquemia miocárdica, es la dispersión del periodo refractario secundaria a las diferencias regionales en la DPA. La activación de los canales K_{ATP} produce un aumento de la salida de potasio y una

reducción marcada de la DPA, pudiendo contribuir significativamente a la inducción de arritmias malignas reentrantes mediante el cambio de la generación del impulso, conducción, o una combinación de ambos (ver revisión de Billman, 1994). Debido a la alta densidad de canales en la membrana del sarcolema, la apertura de los canales $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ puede acortar significativamente el PA, y si hay suficientes canales abiertos, puede hacer a las células inexcitables manteniendo el potencial de membrana muy cerca del potencial de equilibrio de Nernst del potasio. La heterogeneidad patológica en la duración del potencial de acción aumenta la dispersión de la refractariedad en el tejido, favoreciendo las reentradas (ver revisión de Brown & O'Rourke, 2010).

Parece pues, que los fármacos que bloquean el canal K_{ATP} pueden proteger contra la formación y perpetuación de la FV, mientras que la activación de la corriente $I_{\text{K}_{\text{ATP}}}$ puede ser “cardiotóxica” por inducción de arritmias ventriculares por reentradas (ver revisión de Li & Dong, 2010). Sin embargo, diversas observaciones científicas han generado un debate sobre los distintos beneficios del bloqueo del canal K_{ATP} del sarcolema y/o de la mitocondria en la protección frente a la isquemia miocárdica. Así, Vajda et al. (2007), observaron que la inhibición del canal K_{ATP} del sarcolema redujo la incidencia de arritmias ventriculares letales y mejoró la supervivencia tanto durante la isquemia aguda del miocardio como en la reperfusión. Este efecto beneficioso se correlacionó con la prolongación de la repolarización. Por el contrario, la inhibición del canal K_{ATP} mitocondrial no mejoró la supervivencia ni redujo la aparición de arritmias inducidas por la reperfusión.

Asimismo, un papel arritmogénico del canal sarcK_{ATP} se ha confirmado en estudios que utilizan glibenclamida, que bloquea tanto las isoformas mitocondriales como sarcolémicas de los canales K_{ATP}, o los bloqueantes específicos del sarcolema (HMR 1833 o HMR 1098, la sal sódica del HMR 1883). El bloqueo de los canales sarcK_{ATP} con HMR1883 disminuye la incidencia de arritmia ventricular en diferentes modelos animales (ver revisión de Brown & O'Rourke, 2010). El empleo de glibenclamida, reduce la acumulación extracelular de potasio y atenúa o neutraliza la reducción de la duración del PA en miocitos bajo hipoxia, en tejido cardiaco aislado y en corazones con isquemia regional o global (ver revisión de Billman, 1994). En contraste, la activación de la corriente de potasio sensible a ATP con el pinacidilo provoca una marcada dispersión de la repolarización y del periodo refractario entre el epicardio y el endocardio, lo que lleva al desarrollo de extrasístoles. Estas extrasístoles fueron bloqueadas por la glibenclamida en preparaciones de miocardio ventricular aislado de perro (Di Diego & Antzelevitch, 1993). En este sentido, como se ha indicado y más adelante se profundizará, se ha atribuido clásicamente a la heterogeneidad eléctrica un papel fundamental en la aparición y perpetuación de las arritmias por reentrada (Han & Moe, 1964; citados por Jalife, 2000). En la heterogeneidad del periodo refractario juega un papel muy importante el canal K_{ATP}. Ello lo demuestran diversos estudios publicados (Tweedie et al., 1993; Billman et al., 1998; citados por Billman, 2008) en los que utilizando glibenclamida se atenuaban las reducciones del periodo refractario inducidas por la isquemia y cuando se utilizaba pinacidilo se producía una marcada dispersión del periodo refractario (Di Diego & Antzelevitch, 1993). En un estudio realizado en perros anestesiados sometidos a toracotomía, se

demonstró la atenuación ejercida por la glibenclamida sobre la elevación del segmento S-T (indicador clínico clásico de lesión miocárdica transmural aguda) inducida por la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (Kondo et al., 1996, citados por Billman, 2008). Este mismo resultado se observó también en un estudio realizado por Billman y colaboradores (Billman et al., 1998, citados por Billman, 2008) en perros con infarto de miocardio cicatrizado a los que se les indujo FV, demostrando además la prevención que ejercía la glibenclamida sobre el incremento en la parte descendente de la onda T (indicador de dispersión de la repolarización) inducido por la isquemia.

Las investigaciones clínicas han venido a apoyar los resultados obtenidos en el campo de la investigación experimental. Así, en un ensayo clínico efectuado en 207 pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) descompensada, de los que el 16% eran diabéticos en tratamiento con alguna sulfonilurea (y sin tratamiento adicional con ningún fármaco vasoactivo o antiarrítmico), mostraron una menor incidencia de arritmias ventriculares complejas en el marco de ICC grave (Aronson et al., 2003).

Asimismo, en un estudio electrocardiográfico en un modelo de corazón aislado, según técnica de Langendorff, procedente de humanos portadores de miocardiopatía, y a los que se les sometió a hipoxia global, se demostró que la glibenclamida durante la FV, promovía la desfibrilación espontánea de los corazones con cardiomiopatía en los primeros instantes de la FV, atenuando la

heterogeneidad espacio-temporal de la refractariedad durante la fase prematura de la arritmia (Farid et al., 2011).

Al mismo tiempo, el uso de glibenclamida en preparaciones de corazones humanos con isquemia finalizaba los *flutter*/fibrilación inducidos por el abridor del canal K_{ATP} , pinacidilo, y restablecía la disminución de la duración del PA ejercida por el mismo y por el abridor del canal K_{ATP} mitocondrial, diazóxido (Fedorov et al., 2011).

Por otra parte, y en relación a las anormalidades que produce la isquemia sobre el segmento S-T del ECG, se ha visto que los canales K_{ATP} también pueden contribuir significativamente (ver revisión de Billman, 2008). La apertura de canales $sarck_{ATP}$ durante la isquemia cardiaca conduce a la heterogeneidad de la fase de meseta del PA del miocardio e induce la desviación (elevación o depresión) del segmento S-T del ECG (Li et al., 2000; citados por Quast et al., 2004). En un ensayo clínico publicado (Goldberg, 1988, citado por Billman, 2008) se vio que el 30% de los pacientes que tomaban pinacidilo (activador de los canales K_{ATP}) como medicación antihipertensiva presentaban en el electrocardiograma anormalidades en la onda T. Asimismo, utilizando el mismo fármaco inyectado intracoronariamente en perros anestesiados, se observó cómo éste provocaba una elevación del segmento S-T muy similar al inducido por la isquemia (Kubota et al., 1993; citados por Billman, 2008). Contrariamente, la glibenclamida corrige los cambios electrocardiográficos del segmento S-T asociados con la isquemia miocárdica. Asimismo, en un estudio retrospectivo en el que se analizaron los electrocardiogramas de pacientes con diabetes tipo 2 e infarto de miocardio, se vio que en los pacientes

tratados con "sulfonilureas de todo tipo", la elevación del segmento S-T inducida por la isquemia se redujo y estos pacientes fueron significativamente menos propensos a presentar los criterios electrocardiográficos estándares para la admisión a la terapia trombolítica (Huizar et al., 2003; citados por Quast et al., 2004).

1.2.3. El ejercicio físico crónico como maniobra protectora miocárdica.

1.2.3.1. Generalidades.

Han sido investigados numerosos enfoques para lograr cardioprotección contra la lesión por la isquemia-reperusión, y hasta la actualidad, la única contramedida práctica y sostenible capaz de proporcionar cardioprotección es la práctica de sesiones regulares de ejercicio de resistencia. Asimismo, ha sido descrito que la cardioprotección inducida por el ejercicio es bifásica: 1) La primera fase de la cardioprotección se adquiere rápidamente después de una sesión de ejercicio físico agudo (es decir, 30 minutos después del ejercicio). Sin embargo, esta protección inicial se pierde rápidamente en menos de 3 horas después del ejercicio; 2) La segunda fase de la cardioprotección inducida por el ejercicio se produce dentro de las 24 horas después de la sesión de ejercicio y persiste durante al menos 9 días después de una rutina de ejercicio de 5 días. Es mucho más robusta que la "ventana" de protección temprana antes mencionada (ver revisión de Powers et al., 2014a).

Diversos estudios epidemiológicos en humanos han demostrado que el ejercicio regular reduce el riesgo de muerte durante la agresión miocárdica por isquemia-reperfusión. En este sentido, se ha encontrado en pacientes que habían sufrido un infarto de miocardio y que presentaban fracciones de eyección bajas, una reducción en la severidad y en la frecuencia de las arritmias, tras ser sometidos a un programa de ejercicio físico crónico (Paffenbarger & Hale, 1975; Hertzeanu et al., 1993). Otras observaciones demuestran una menor incidencia de muerte súbita en pacientes con un buen nivel de “forma”, o que tenían un gasto energético alto por las características de su trabajo físico (Ekelund et al., 1988). En otro estudio realizado en pacientes con historia previa de infarto de miocardio, y que siguieron un programa de rehabilitación con ejercicio físico, se encontraron reducciones significativas en la incidencia de muerte súbita (Berlin & Colditz, 1990). Así, también se ha demostrado que la incidencia de muerte súbita de origen cardiaco era mayor en individuos con menor nivel de actividad física regular, que en aquellos sujetos en los que el nivel de actividad física regular era mayor (Bartels et al., 1997; citados por Orts, 2007).

Por otra parte, se han publicado las diversas modificaciones de procesos que, directa o indirectamente, pueden explicar el efecto beneficioso del ejercicio físico regular. Entre ellos se ha postulado la mejora en la circulación coronaria (Brown et al., 2003), el aumento de los niveles de proteínas de choque térmico del miocardio (Harris & Starnes, 2001; Demirel et al., 2003; Such et al., 2008), la mejora en la capacidad antioxidante cardiaca (Ramires & Ji, 2001; Quindry et al., 2010), la activación de la proteinquinasa C (Yamashita et al., 2001),

cambios en las proteínas reguladoras del calcio (Collins et al., 2005), sensibilidad reducida a la apertura del poro de transición mitocondrial inducida por Ca^{2+} (Marcil et al., 2006), y/o la reducción de factores que modifican el consumo de oxígeno como la frecuencia cardíaca (Billman & Kukielka, 2007).

Otros autores atribuyen como mecanismo básico cardioprotector inducido por el ejercicio físico al aumento de proteínas de estrés del retículo endoplásmico y/o una elevada actividad miocárdica de la enzima ciclooxigenasa 2 (ver revisión de Powers et al., 2008).

Además, también ha sido propuesto que el efecto cardioprotector del ejercicio físico crónico podría estar relacionado con modificaciones del equilibrio existente en el sistema nervioso (SN) vegetativo, entre el SN simpático y el SN parasimpático, estando a favor de este último, dadas las investigaciones en las que al aumentar la actividad parasimpática se ha obtenido un efecto protector (Zuanetti et al., 1987; Billman, 1990). Asimismo, algunos autores (Shi et al., 1995; citados por Such et al., 2002) apoyan el hecho de que la reducción en la frecuencia cardíaca en reposo como consecuencia del entrenamiento de resistencia es el resultado de un aumento del tono vagal. El concepto de un aumento de la actividad parasimpática por el entrenamiento está soportado por las observaciones de aumento de los niveles de acetilcolina en el miocardio de animales entrenados (Bjornstad et al., 1993; citados por Such et al., 2002).

No obstante, y a pesar de las anteriores consideraciones, en opinión de un número importante de autores, en la actualidad aun

están por dilucidar los mecanismos exactos por los que el entrenamiento físico exhibe un efecto protector frente a la muerte súbita cardíaca (Wannamethee & Shaper, 2001; Ascensão et al., 2007; Hamer & Stamatakis, 2008). Incluso algunos de los anteriores factores que se han implicado en el efecto protector del ejercicio físico se hallan cuestionados en la actualidad por los mismos u otros autores. Además, parece posible que existan otros mediadores cardioprotectores, que puedan contribuir a la cardioprotección inducida por el ejercicio físico crónico. En este sentido, de los anteriores mecanismos cardioprotectores propuestos, los estudios sugieren que las mejoras en la circulación coronaria colateral y en la función endotelial, el aumento de las proteínas de estrés del retículo endoplásmico, la elevada actividad de la ciclooxigenasa 2 y el aumento de los niveles de la proteína de choque térmico HSP72 del miocardio no son esenciales para lograr la cardioprotección inducida por el entrenamiento (ver revisiones de Powers et al., 2008; y Powers et al., 2014b).

Las evidencias recientes revelan que la elevada actividad de la enzima superóxido dismutasa (MnSOD) miocárdica es un importante contribuyente en la cardioprotección inducida por el entrenamiento (ver revisión de Powers et al., 2008). Asimismo, ha sido documentado que el aumento en la producción de óxido nítrico por una actividad incrementada de la óxido nítrico sintetasa endotelial inducida por el ejercicio es importante para lograr la cardioprotección. También ha sido descrito que el ejercicio físico crónico promueve la expresión diferencial de numerosas proteínas antioxidantes mitocondriales de los miocitos ventriculares (entre las más destacables la superóxido

dismutasa 2), resultando en un fenotipo mitocondrial que resiste el daño inducido por la isquemia-reperfusión y confiere cardioprotección. Este mecanismo parece contribuir especialmente durante la primera fase de la cardioprotección inducida por el ejercicio citada en líneas anteriores (ver revisiones de Powers et al., 2014a; y Powers et al., 2014b). No obstante, otros estudios no han encontrado modificaciones por el entrenamiento físico de la actividad enzimática antioxidante en diversos tejidos (Such et al., 2002). Asimismo, está bien establecido que el ejercicio físico habitual mejora los factores de riesgo cardiovasculares, tales como la obesidad (Wood et al., 1991), la diabetes mellitus tipo 2 y la hipertensión arterial (Kokkinos et al., 1995). En este último estudio, realizado en varones tras realizar ejercicio aeróbico intenso, se demostró una reducción significativa en la presión arterial diastólica y una regresión de la hipertrofia ventricular.

También ha sido propuesto como mecanismo principalmente implicado en la cardioprotección y en los efectos electrofisiológicos beneficiosos del ejercicio físico crónico sobre el miocardio a la corriente vinculada a los canales K_{ATP} , tanto sarcolémicos como mitocondriales.

Finalmente, también ha sido descrito, que alguno de los mecanismos que acabamos de citar, por los que el ejercicio físico ejerce un efecto cardioprotector antiarrítmico, son específicos del tipo de lesión por isquemia y perfusión experimentado. Así, la MnSOD y la corriente vinculada a los canales mito K_{ATP} son independientemente responsables de la prevención inducida por el ejercicio, de arritmias

ventriculares tras isquemia y reperfusión de corta duración. En respuesta a una mayor duración de los ciclos de isquemia y reperfusión, la MnSOD, los opioides endógenos, el manejo del calcio de reserva, y la actividad de los canales $\text{sarckK}_{\text{ATP}}$ median la protección ejercida por el entrenamiento frente a la muerte del tejido (Quindry et al., 2012). En el apartado 1.2.4. de la presente tesis se va a profundizar en el estudio del papel que los canales K_{ATP} tienen en la protección miocárdica en los animales entrenados, así como en las controversias suscitadas hasta la fecha respecto a dicha participación.

1.2.3.2. Estudio especial de los efectos electrofisiológicos del ejercicio físico crónico.

Está claramente documentado, que las modificaciones de las propiedades eléctricas que vamos a comentar están estrechamente relacionadas con la aparición de arritmias por reentrada; es por eso que les hemos dedicado un apartado especial. Veremos el efecto que ejerce el ejercicio físico crónico sobre la refractariedad miocárdica y la dispersión de la misma, como parámetro de heterogeneidad miocárdica, así como sobre la complejidad de la activación eléctrica del miocardio ventricular, que se halla relacionada con las dos anteriores propiedades.

1.2.3.2.1. Efecto del ejercicio físico crónico sobre la refractariedad miocárdica.

En un primer lugar, cabe destacar que la refractariedad miocárdica es una propiedad, junto con la velocidad de conducción, que determina la longitud de onda del proceso de activación del

miocardio, que a su vez es un factor relacionado con la aparición y la estabilización de las arritmias por reentrada (Wijffels et al., 1995, citados por Such et al., 2008). Por lo tanto, la investigación de la modificación de la refractariedad miocárdica por el entrenamiento físico ayuda a explicar las razones por las que el entrenamiento físico aeróbico parece aumentar la estabilidad eléctrica cardíaca y ejerce protección contra la muerte súbita cardíaca, producida por arritmias por reentrada en la mayoría de los casos (ver revisión de Billman, 2002).

Efectivamente, nuestro grupo de investigación, usando un modelo de corazón aislado y perfundido de conejo, ya planteó en trabajos previos la posibilidad de que el ejercicio pudiera producir modificaciones intrínsecas de parámetros electrofisiológicos relacionados con la aparición del fenómeno de la reentrada y por tanto de la FV. Nuestros primeros resultados parecían apuntar a una modificación de la refractariedad ventricular, observándose que el periodo refractario funcional del ventrículo izquierdo era un 20% mayor en los animales entrenados respecto a los controles. No se observaron diferencias significativas en los parámetros restantes de refractariedad analizados entre los animales entrenados y no entrenados (Such et al., 2002). Estos resultados fueron corroborados por posteriores estudios, en los que se volvió a demostrar que el entrenamiento físico crónico exhibía modificaciones en la refractariedad ventricular por la prolongación del periodo refractario efectivo ventricular y del periodo refractario funcional ventricular, así como la disminución de la FD durante la FV. Estas modificaciones producidas por el entrenamiento son interpretadas como un efecto

protector frente a diversas perturbaciones eléctricas que desencadenan en arritmias reentrantes, como la FV (Such et al., 2008). Asimismo, la disminución en la FD durante la FV observada en los conejos entrenados, en opinión de algunos autores, es una modificación con el mismo significado electrofisiológico que la modificación del periodo refractario, ya que existe una correlación inversa entre la frecuencia durante la FV y la refractariedad (para revisión ver Chorro et al., 2000a).

1.2.3.2.2. Efecto del ejercicio físico crónico sobre la heterogeneidad electrofisiológica.

El tejido cardiaco no es un sincitio eléctrico homogéneo y presenta muchas heterogeneidades tanto en las propiedades de la membrana celular como en los componentes estructurales. En este sentido se ha registrado una falta de homogeneidad en el potasio extracelular, en el periodo refractario y en la duración del potencial de acción entre el epicardio y endocardio (ver revisión de Billman, 1994). Por otra parte, se ha descrito que los elementos que contribuyen a la heterogeneidad presentan una mayor importancia en un sustrato remodelado por condiciones patológicas y son los principales determinantes de la formación de bloqueos de conducción, de la dispersión espacial de la repolarización, etc. Todos ellos son factores implicados directamente en el establecimiento y perpetuación de las arritmias reentrantes (ver revisión de Kléber & Rudy, 2004). Efectivamente, el factor más contribuyente en la instauración y mantenimiento de la FV, particularmente durante la isquemia miocárdica, es la dispersión o heterogeneidad del periodo refractario

producida por las diferencias regionales en la duración del PA (Wit & Janse, 1989). Asimismo, en estudios posteriores, se ha confirmado que debido a la heterogeneidad de la refractariedad de las células cardíacas en diferentes regiones del corazón, las activaciones generadas por los estímulos en las zonas excitables están bloqueadas unidireccionalmente en zonas de mayor refractariedad, produciendo reentrada y, finalmente FV (Chattipakorn et al., 2005). Ya clásicamente Han y Moe (1964), citados por Jalife (2000), establecieron la importancia de la heterogeneidad en el periodo refractario para la inducción de fibrilación ventricular.

Pese a las publicaciones sobre el efecto del ejercicio físico sobre la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio que origina la oclusión arterial coronaria aguda (Hajnal et al., 2005), disponemos de menos información sobre los efectos del entrenamiento sobre tal parámetro en el corazón normóxico. Pelechano et al. (2007) hallaron que la dispersión de la frecuencia dominante durante la fibrilación ventricular inducida sin interrumpir la perfusión era menor en los corazones procedentes de animales entrenados. Indirectamente es una medida relacionada con la refractariedad y por tanto de alguna manera representa la dispersión de la refractariedad (para revisión ver Chorro et al., 2000a).

Aunque nosotros no disponemos de más información respecto al efecto del ejercicio físico sobre la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio en circunstancias de normal perfusión o de perfusión en condiciones normóxicas, sí que podemos hacer alusión a otros trabajos de investigación que parecen indicar de una manera indirecta

que el entrenamiento disminuye la heterogeneidad. En este sentido, hay que decir que Zaitsev et al. (2000) relataron, tras realizar experimentos en corazón aislado de oveja a los que se les provocó fibrilación ventricular, que el coeficiente de variación (CV) de la frecuencia dominante durante la FV se correlacionaba directamente con la FD durante la fibrilación, de tal modo que a una frecuencia dominante mayor le correspondía un mayor coeficiente de variación y por tanto ello indicaba una mayor heterogeneidad. Sobre la base de este interesante resultado podemos suponer razonablemente que otros trabajos, en los que se ha investigado el efecto del ejercicio físico crónico sobre la FD durante la fibrilación, nos dan una información indirecta y adicional a las primeras observaciones comentadas en este apartado. Así, Such et al. (2008) relataron una disminución de la FD durante la fibrilación en animales sometidos al mismo protocolo de entrenamiento que el usado en la presente tesis. Zarzoso et al. (2012) han relatado una disminución de la frecuencia dominante durante la FV en los animales entrenados, también con el mismo protocolo de ejercicio en cinta rodante.

Por otro lado, en lo que respecta al efecto del ejercicio físico sobre la heterogeneidad electrofisiológica miocárdica, existen algunos trabajos publicados en los que se ha investigado el efecto del entrenamiento sobre este parámetro tras oclusión arterial coronaria aguda (Hajnal et al., 2005). Estos autores usaron como parámetro de inhomogeneidad el tiempo de activación eléctrica de distintos puntos del miocardio ventricular. En investigaciones previas en perros sometidos a determinados protocolos de ejercicio físico y a oclusión coronaria, se observó una menor incidencia de arritmias letales y una

menor inhomogeneidad electrofisiológica (Babai et al., 2002). Asimismo, también disponemos de datos obtenidos por nuestro grupo investigador. Such et al. (2006) estudiaron la FD durante la FV en corazones aislados de conejos sometidos a oclusión coronaria en un sistema Langendorff y observaron un mantenimiento del coeficiente de variación de la frecuencia dominante durante la FV a los 30 minutos de la oclusión coronaria en los corazones procedentes de animales entrenados, mientras que tal parámetro aumentó en los controles. Por lo tanto, parece que el ejercicio físico crónico disminuye la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio. Esto coincide además con muy recientes observaciones realizadas en nuestro grupo de investigación (Parra, 2011; Parra et al., 2012).

1.2.3.2.3. Efecto del ejercicio físico crónico sobre el proceso de activación eléctrica del miocardio.

Acabamos de describir como el ejercicio físico puede actuar sobre una serie de propiedades y/o parámetros como son la refractariedad y la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio, que condicionan el proceso de activación miocárdica durante la FV.

Han sido publicados diversos estudios en los cuales, tras recurrir a otras maniobras que modifican la duración del potencial de acción, la refractariedad y la heterogeneidad electrofisiológica, se ha podido observar un incremento de la complejidad de la arritmia. En este sentido, nuestro grupo de investigación, recurriendo al estiramiento local, analizó la complejidad durante la FV en un modelo similar de corazón aislado y perfundido, sin interrupción de la perfusión global.

En estos experimentos, el incremento de la complejidad de la activación miocárdica coincidió con una modificación simultánea de la refractariedad y de la frecuencia de activación eléctrica durante la FV (Chorro et al., 2000c), esto último correlacionado con la heterogeneidad electrofisiológica (Zaitsev et al., 2000).

En un estudio previo realizado por nosotros (Díaz, 2012), utilizando un protocolo de entrenamiento similar, y un modelo análogo de corazón aislado y perfundido, al del presente trabajo, se pudo evidenciar que los corazones de los animales entrenados exhibieron un nivel de complejidad menor en todo el miocardio ventricular, tanto en condiciones de perfusión normalmente oxigenada como tras isquemia regional aguda. Sin embargo, a parte de esta referencia, existe muy poca información publicada en relación al efecto del entrenamiento sobre el proceso de activación del miocardio durante la fibrilación ventricular, y la información que puede deducirse sobre los efectos del ejercicio a nivel de los parámetros que pueden modificar el mencionado proceso, es indirecta y en cierto modo especulativa. Por ello, nuestra atención se ha centrado sobre este tema, en condiciones de perfusión normóxica en un corazón aislado y en el mismo corazón sometido a isquemia regional aguda.

1.2.4. Participación de los canales K_{ATP} en los efectos electrofisiológicos beneficiosos del ejercicio físico crónico sobre el miocardio sometido a isquemia aguda.

Desde hace aproximadamente una década se han venido planteando investigaciones dirigidas a conocer si el efecto del ejercicio

físico crónico podría modificar de alguna manera la corriente vehiculada por el canal K_{ATP} en el corazón isquémico (Jew & Moore, 2002; Powers et al., 2008; Quindry et al., 2010) y ello podría relacionarse con el efecto protector del mismo.

Si, como ya se ha expuesto anteriormente, el papel de los canales K_{ATP} de membrana celular en la protección miocárdica permanece no suficientemente establecido, la implicación del canal K_{ATP} en los efectos beneficiosos del ejercicio físico en la isquemia aguda de miocardio también está siendo objeto de investigación y de controversias hasta la actualidad. Si bien parece ser, a la vista de las publicaciones, que aunque una gran mayoría de autores opina que el ejercicio físico opera beneficiosamente en la isquemia miocárdica a través de aumentar la actividad del canal K_{ATP} , a nosotros nos han surgido planteamientos que, al menos en parte, parecen señalar en otra dirección. En primer lugar, parece que según se desprende de ciertas investigaciones, el ejercicio físico crónico parece actuar, más bien, bloqueando la corriente vehiculada por el canal K_{ATP} del sarcolema; y en segundo lugar, alguna de nuestras observaciones y resultados parecen asemejar los efectos del entrenamiento físico durante la isquemia miocárdica aguda a lo que produce el bloqueo de la mencionada corriente.

Expondremos, en un primer lugar, las investigaciones que más bien apuntan a que el entrenamiento físico produce un efecto activador del canal K_{ATP} , tanto sarcolémico como mitocondrial, para a continuación comentar las observaciones que nos hacen cuestionar esta interpretación y apuntar en sentido contrario.

En este sentido, y en relación a si la cardioprotección producida por el ejercicio físico crónico está mediada por los canales sarcK_{ATP} o mitoK_{ATP}, se ha demostrado que los canales sarcK_{ATP} (SUR2A/K_{ir}6.2) son requeridos para la adaptación del corazón al estrés. Ratones *knock out* Kir6.2 eran mucho menos tolerantes al estrés físico y simpático que los ratones de tipo salvaje. Los ratones deficientes del canal sarcK_{ATP} desempeñaron pobremente el test de ejercicio en cinta rodante. Bajo el estímulo vigoroso β-adrenérgico, estos animales murieron a causa de la arritmia; los cardiomiocitos mostraron una reducción en la duración del potencial de acción, una sobrecarga de Ca²⁺, y bandas de contracción del miocardio (Zingman et al., 2002; citados por Quast et al., 2004). Asimismo, se ha establecido que el ejercicio aumenta la expresión de los canales sarcK_{ATP} en el miocito cardíaco. Usando un modelo de isquemia-reperfusión en corazones aislados y perfundidos a través del sistema Langendorff, se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de los canales sarcK_{ATP} debilitaba el efecto beneficioso inducido por el ejercicio físico crónico contra el infarto de miocardio inducido por la isquemia y reperfusión. Estos mismos autores, estudiaron el papel de los canales mitoK_{ATP} en la cardioprotección mediada por el ejercicio físico crónico. El uso de un inhibidor del canal mitoK_{ATP} les permitió observar que dichos canales no eran esenciales mediadores de la cardioprotección inducida por el ejercicio contra el infarto de miocardio inducido por la isquemia y reperfusión. Sin embargo, en la opinión de los autores, el hecho de que el inhibidor de canal mitoK_{ATP} (5-hidroxicanoato) utilizado en estos experimentos pudiera ejercer otros efectos sobre las mitocondrias, no permitió clarificar la cuestión (Brown et al., 2005).

Por ello, estudios posteriores han pretendido examinar en qué medida los canales $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ y $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ proporcionan una protección antiarrítmica en los corazones entrenados durante la isquemia y reperfusión. Entre ellos cabe citar un estudio realizado en ratas entrenadas a las que se les administró 5-hidroxi-decanoato, como bloqueante de los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, o HMR1098, alternativamente, como bloqueante de los canales $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$. Se evidenció en tal estudio que la inhibición de los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ atenuaba los efectos antiarrítmicos de ejercicio, mientras que la inhibición de los canales $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ no lo hizo. Asimismo, se observó una elevación del estrés oxidativo en los corazones sedentarios y en el de los animales ejercitados en los que se utilizó el bloqueante de los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Estos hallazgos sugieren que la apertura del canal $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ proporciona protección antiarrítmica como parte de la cardioprotección mediada por el ejercicio contra la isquemia y reperfusión, que puede estar asociada con la preservación del equilibrio redox (Quindry et al., 2010). Posteriormente, estos mismos autores, utilizando un modelo de isquemia y reperfusión más duradero (50 minutos de isquemia y 120 minutos de reperfusión), observaron que en la cardioprotección inducida por el ejercicio frente a la necrosis post isquemia y reperfusión estaban implicados los canales $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$, mientras que los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ no fueron esenciales. Este resultado sugirió que los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ median en una “ventana de protección antiarrítmica”, que se pierde entre los 20 y 50 minutos de isquemia continua. Por el contrario, la protección contra la apoptosis post isquemia y reperfusión era independiente de la actividad de ambos canales (Quindry et al., 2012).

De modo similar, ha sido planteado que la regulación producida por la expresión del canal K_{ATP} parece ser parte de la remodelación cardiaca inducida por el ejercicio y se ha relacionado con una mayor resistencia a la lesión isquémica del miocardio (para revisión ver Zingman et al., 2011). Estos mismos autores demostraron un incremento significativo en la expresión de subunidades $K_{i,6.2}$ y SUR2A en los extractos de proteínas de los ventrículos de ratones entrenados (figura 1.8.).

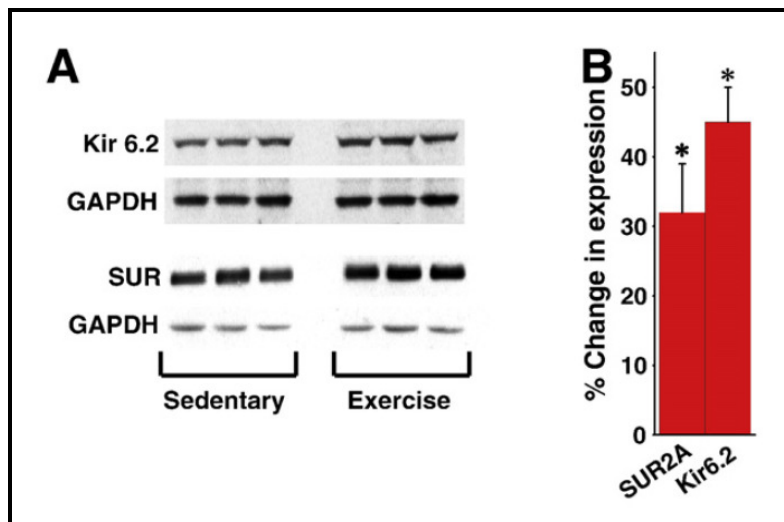


Figura 1.8. Aumento de la expresión cardiaca de canales K_{ATP} funcionales por el ejercicio. **A:** Western blots representativos de las subunidades Kir6.2 y SUR2A del canal K_{ATP} en extractos de proteínas de ventrículos izquierdo de ratones en condiciones sedentarias y sometidos a ejercicio. **B:** Incremento en la expresión de subunidades Kir6.2 y SUR2A en respuesta al ejercicio en comparación con los sedentarios (ambos $n=10$ y $*p<0.05$ vs. sedentarios). Tomado de Zingman et al., 2011.

Este aumento en la expresión de los canales K_{ATP} inducido por el ejercicio mejoraba la proporción y la magnitud del acortamiento del potencial de acción y reducía el consumo de energía cardiaca en

respuesta a la aceleración del ritmo cardiaco. Tales hallazgos permitieron abundar en la idea de que los canales K_{ATP} son críticos para el ajuste de la excitabilidad del miocito sometido a dinámicas fisiológicas normales de trabajo cardíaco; y que el aumento de la expresión del canal de K_{ATP} acelera y aumenta esta respuesta como parte de la adaptación fisiológica al entrenamiento físico crónico (Zingman et al., 2011).

Asimismo, y como ya se ha indicado anteriormente, Brown et al. (2005), usando un modelo de corazón aislado similar al que hemos utilizado en la presente tesis, publicaron que el entrenamiento físico aumentaba la expresión de los canales K_{ATP} de membrana celular y que la inhibición farmacológica de dichos canales empeoraba los efectos beneficiosos del ejercicio físico contra el daño producido por la isquemia y posterior reperfusión.

Estos hallazgos han hecho pensar que los efectos electrofisiológicos beneficiosos del ejercicio físico crónico en el corazón isquémico, pueden relacionarse, al menos en parte, por el efecto de la corriente que vehiculan los canales mencionados, $mitoK_{ATP}$ y/o $sarcK_{ATP}$.

Contrariamente a lo hasta ahora expuesto, citaremos, tal y como antes hemos señalado, aquellos trabajos de investigación que parecen indicar que el ejercicio físico crónico opera en la dirección contraria, es decir, aumentando la sensibilidad del corazón al bloqueo de los canales K_{ATP} . Asimismo, comentaremos los resultados

encontrados por nuestro grupo de investigación que apuntan hacia la misma línea.

En este sentido, se ha demostrado que el entrenamiento físico suprime la sensibilidad de los cardiocitos del ventrículo izquierdo a los cambios de la anoxia con respecto a las características cuantitativas y temporales de la expresión de la corriente $I_{K_{ATP}}$. Se ha observado que el 59% de los cardiocitos aislados del ventrículo izquierdo de ratas sometidas a un protocolo de entrenamiento expresaban $I_{K_{ATP}}$, en comparación con el 85% del grupo no entrenado. El tiempo de expresión de dicha corriente se produjo un 30% más tarde y el pico de densidad $I_{K_{ATP}}$ fue significativamente menor en el grupo entrenado (figura 1.9.). Existen dos posibles hipótesis que pueden explicar estos hallazgos: una es que el ATP subsarcoplásmico puede estar mejor conservado en la proximidad de los canales K_{ATP} de las células de los animales entrenados; la otra es que la concentración inhibitoria de los canales K_{ATP} se reduce por el entrenamiento (Jew & Moore, 2002).

Estos mismos autores, un año antes, usando una preparación de corazón aislado y perfundido de rata sometido a un protocolo de isquemia-reperfusión global, ya observaron que el entrenamiento tenía un efecto supresor respecto a la apertura de los canales K_{ATP} , o de modo similar, que el entrenamiento aumenta la afinidad al bloqueo de estos canales con glibenclamida. El incremento de la sensibilidad a la glibenclamida en los corazones entrenados podría implicar un papel al bloqueo de los canales K_{ATP} en la cardioprotección inducida por el ejercicio físico crónico contra el daño producido por la isquemia-reperfusión (Jew & Moore, 2001).

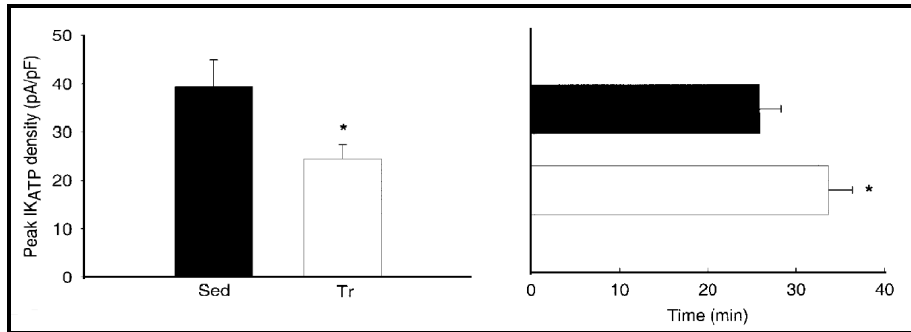


Figura 1.9. Parte izquierda: Pico de densidad de la corriente $I_{K_{ATP}}$ inducida por la anoxia (independiente del tiempo) en cardiocitos de ratas entrenadas (Tr) y sedentarias (Sed). El entrenamiento en cinta rodante resultó en una significativa reducción de la densidad de corriente (efecto del entrenamiento, $p < 0,05$). **Parte derecha:** Tiempo para la expresión de la corriente $I_{K_{ATP}}$ después de la anoxia. Cardiocitos en el grupo Tr (barra blanca; $n=26$) expresaron $I_{K_{ATP}}$ más tarde ($< 0,05$) que los cardiocitos en el grupo Sed (barra negra; $n=28$). Tomado de Jew & Moore, 2002.

Por otra parte, se ha descrito que dicho efecto atenuante del entrenamiento sobre la corriente $I_{K_{ATP}}$ puede ser consecuencia de un efecto previo sobre los sistemas antioxidantes cardiacos y sobre la expresión de la proteína de choque térmico HSP72. Efectivamente se ha demostrado que la cardioprotección asociada a HSP72 frente al daño producido por la isquemia y reperfusión está mediada, al menos en parte, por los canales K_{ATP} (Joyeux et al., 1998). También se ha demostrado que la probabilidad de apertura de los canales K_{ATP} aumenta con la presencia de radicales libres del oxígeno, por la modulación de los sitios de unión del ATP de estos canales (Tokube et al., 1998). Por lo tanto, se ha planteado la posibilidad de que el aumento de los niveles de proteínas de choque térmico del miocardio (Harris & Starnes, 2001; Demirel et al., 2003) y la mejora en la capacidad antioxidante cardiaca (Ramires & Ji, 2001; Quindry et al., 2010) por el ejercicio físico crónico puedan representar adaptaciones para suprimir la apertura del canal K_{ATP} , resultando en una adaptación

diseñada para preservar la función mecánica del tejido y el suministro de oxígeno al miocárdico (para revisión ver Jew & Moore, 2002).

Asimismo, comentaremos los resultados encontrados por nuestro grupo de investigación que apuntan en el mismo sentido. Del-Canto et al. (2012a) publicaron que los corazones aislados de conejos en fibrilación ventricular, sometidos a isquemia regional aguda y a los que se le administró glibenclamida, requirieron menor energía para revertir el proceso fibrilatorio que los controles; y, de modo muy similar, el corazón aislado de conejo entrenado requirió la misma cantidad de energía para la reversión de la arritmia que el corazón sometido a bloqueo del canal K_{ATP} . En tal sentido, bloqueo y ejercicio pudieron actuar en la misma dirección en cuanto a los mecanismos básicos sobre los que se asienta la fibrilación y la desfibrilación. Otros trabajos de investigación realizados por nosotros (Alves et al., en prensa), en el modelo de corazón de conejo aislado habitualmente usado, evidencian que la apertura del canal K_{ATP} con pinacidilo es arritmogénica incluso previamente a la oclusión coronaria; posteriormente a la oclusión, la reversión del proceso fibrilatorio resultó imposible usando energías muy superiores a las empleadas en los corazones de animales entrenados y/o tratados con glibenclamida. A pesar de la vasta investigación y del hecho que los mecanismos de la desfibrilación siguen siendo objeto de debate (Chen et al., 1998; Dillon et al., 1998; Efimov et al., 1998; Chattipakorn et al., 2001), y aunque se ha publicado que la desfibrilación no depende de la dispersión de la repolarización creada por los choques eléctricos (Chattipakorn et al., 2001), el papel de la heterogeneidad

electrofisiológica en la vulnerabilidad cardiaca a los choques eléctricos ha sido recientemente planteado (Maharaj et al., 2008).

Las observaciones realizadas por nosotros, junto con las anteriormente citadas en relación a investigaciones realizadas por otros autores, parecen indicar que el ejercicio físico confiere cardioprotección al corazón contra el insulto isquémico probablemente al aumentar la sensibilidad del corazón al bloqueo de los canales K_{ATP} , contrariamente a lo que han publicado la mayor parte de los autores, y por ello estos hallazgos han servido de base para plantear que los efectos electrofisiológicos beneficiosos del ejercicio físico crónico en el corazón isquémico pueden relacionarse, al menos en parte, con un efecto bloqueante de la citada corriente.

1.3. Resumen de la justificación de los objetivos. Hipótesis de trabajo.

Habida cuenta de: a) que el ejercicio físico crónico protege frente a la muerte súbita y los mecanismos que subyacen a este efecto protector no se hallan totalmente dilucidados; b) que un mecanismo propuesto está ligado a la participación del canal K_{ATP} ; c) que en la literatura encontramos abundantes trabajos de investigación que proponen como mecanismo protector del canal K_{ATP} , la apertura del mismo, si bien los datos aportados no son fundamentalmente sobre parámetros electrofisiológicos; d) que algún trabajo de investigación y resultados previos de nuestro grupo parecen apuntar en dirección contraria, esto es, en un efecto protector del ejercicio físico crónico a través de manifestaciones electrofisiológicas de bloqueo del

mencionado canal; y e) que la existencia de polémicas en relación a si el bloqueo o la apertura del canal K_{ATP} es beneficiosa o por el contrario deletérea para el miocardio sometido a isquemia aguda; nos ha parecido de gran interés tratar de contribuir a esclarecer alguno de los puntos mencionados con la realización de la presente tesis.

Nuestra hipótesis de trabajo ha sido: el ejercicio físico crónico ejerce un efecto protector sobre parámetros electrofisiológicos ligados a la instauración y mantenimiento de arritmias reentrantes, como la propia fibrilación ventricular, en el miocardio sometido a isquemia regional aguda, y que estos efectos se hallan ligados al bloqueo del canal K_{ATP} .

1.4. Plan de trabajo.

Para poder alcanzar los objetivos de la presente tesis doctoral, procederemos según un plan de trabajo constituido por las siguientes tareas a desarrollar y que nombraremos por orden cronológico:

1º. Determinar los parámetros electrofisiológicos objeto de la presente investigación en el corazón de conejo aislado y perfundido, en normoxia y tras isquemia regional aguda, de:

- a. Un grupo de animales no entrenados y estabulados el tiempo que dura el proceso del entrenamiento.
- b. Un grupo de animales sometidos al protocolo de entrenamiento.

c. Un grupo de animales no entrenados, establecidos el tiempo que dura el proceso de entrenamiento, a cuyo corazón se le infundirá el bloqueante de los canales K_{ATP} , glibenclamida.

Los parámetros objeto de nuestro estudio se determinarán en el corazón fibrilando, sin interrumpir la perfusión global.

2º. Tras la determinación de los parámetros electrofisiológicos objeto de nuestro estudio, se procederá al análisis de los mismos, así como a la comparación intra e inter grupos aplicando los correspondientes test estadísticos.

3º. Realizados el análisis de los resultados, el tratamiento estadístico de los mismos y la correspondiente discusión referente a los resultados, se procederá a la extracción de las conclusiones más adecuadas.

CAPÍTULO 2

Material y métodos

2.1. Material.

2.1.1. Animales de experimentación.

El presente estudio se realizó en 53 corazones aislados, con un peso medio de $14,61 \pm 1,75$ g y un flujo inicial de $74,62 \pm 13,04$ ml/min, procedentes de conejos macho de la raza *New Zealand White* (*Oryctolagus cuniculus*), de peso medio previo al inicio del protocolo experimental de $3,70 \pm 0,30$ Kg, con 16 semanas de edad y alimentados *ad libitum*. Los animales fueron adquiridos en Granja San Bernardo S.L. (Navarra-España), empresa registrada como centro de cría y suministrador de animales de laboratorio.

2.1.2. Reactivos.

- Solución de Tyrode. Compuesto por CaCl_2 , MgCl_2 , KCl, NaH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl y glucosa, todos ellos de Panreac[®] Química S.A. Las concentraciones (expresadas en mM) de estos electrolitos en el Tyrode son: CaCl_2 2.2, MgCl_2 0.6, KCl 4.7, NaH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 24.2, NaCl 130 y glucosa 12.

- Ketamina (Ketolar[®] Parke-Davis).

- Heparina sódica al 5% (Rovi[®]).

- Povidona Iodada al 10% (Betamadrileño, S.L.)

- Solución de glibenclamida 1 mM, disuelta en 2 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) y Tyrode. Para el bloqueo de los canales K_{ATP} . Se prepara a dicha concentración porque se pretende que alcance una concentración en tejido de 10 μ M (100 veces menos concentrada). Esto se consigue perfundiendo la solución de glibenclamida en el sistema Langendorff con un flujo 100 veces menor al flujo de la solución de Tyrode perfundida (ver sección 2.2.3.2. Protocolo experimental).

2.1.3. Aparatos.

- Tapiz rodante (“treadmill”) de Panlab[®] S.L. (figura 2.1.).



Figura 2.1. Conejo durante el protocolo de entrenamiento físico en el tapiz rodante.

- Balanza de precisión (Precisa Balances[®]) y balanza Soehnle[®].

- Sistema de estimulación:

- Electrodo**s** bipolares de estimulación (de acero inoxidable, diámetro de 0,125 mm y distancia entre electrodos de 1 mm). Uno para la estimulación auricular y otro para la estimulación ventricular. Ubicados en la zona epicárdica a estudiar y conectados al estimulador Grass[®] S88.
- Estimulador Grass[®] S88 (Grass Instruments, Inc., Quincy, MA, U.S.A.), provisto de una unidad de aislamiento de estímulo (SIU5), que permite emitir pulsos rectangulares de corriente, con un amplio rango de duraciones, y con el que se puede controlar parámetros tales como frecuencia de estimulación, intensidad de estímulo y tiempo de duración del estímulo (figura 2.2.). De este modo se consigue una estimulación controlada en una zona concreta.

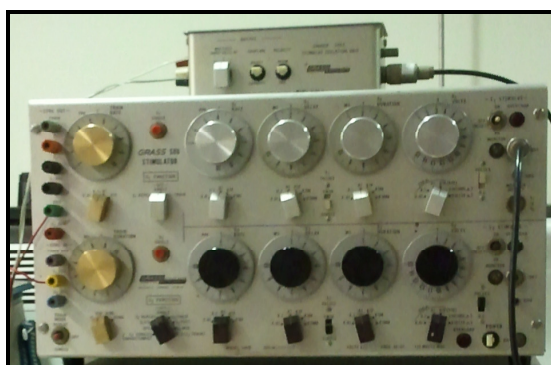


Figura 2.2. Estimulador Grass S88[®].

- Sistema computarizado conectado al estimulador Grass[®] S88 para estimulación programada.

- Sistema de registro:

- Electrodo múltiple, compuesto por 256 electrodos unipolares de acero inoxidable (diámetro de 0,125 mm, distancia interelectrodo de 1 mm), para el registro de los electrogramas ventriculares (figura 2.3.).

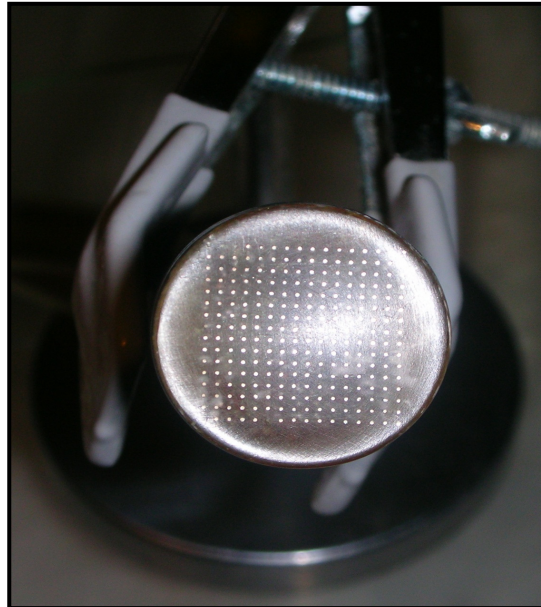


Figura 2.3. Electrodo múltiple de registro. En esta imagen se pueden apreciar claramente los 256 electrodos unipolares que forman la placa.

- Electrodo bipolar de registro de plata con diámetro 0,5 mm y distancia interelectrodo de 1 mm, para el registro del auriculograma.
- Sistema de cartografía epicárdica de la actividad eléctrica (MapTech[®], Waalre, Holanda), para la adquisición y digitalización de las señales correspondientes a los electrogramas. Los electrogramas se amplificaron con una ganancia de 100 a 300, se filtraron eliminando

las frecuencias situadas fuera de la banda comprendida entre 1-400 Hz y se multiplexaron. La frecuencia de muestreo en cada canal fue de 1 kHz, con una resolución de 12 bits. Los registros obtenidos a lo largo del experimento fueron almacenados en soporte digital preparado para la adquisición y registro de la actividad eléctrica cardíaca con el fin de poder realizar el análisis posterior de las señales adquiridas (figura 2.4.).

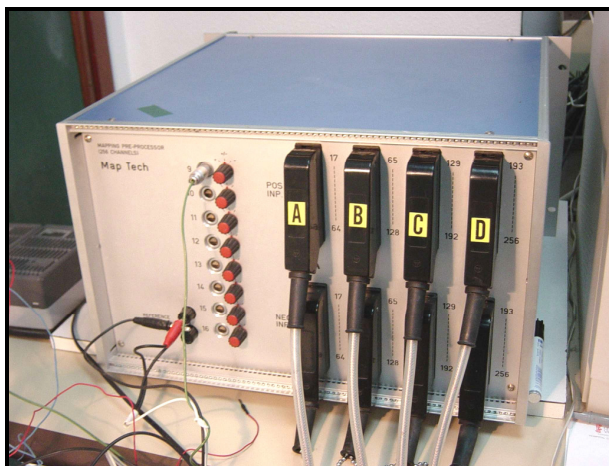
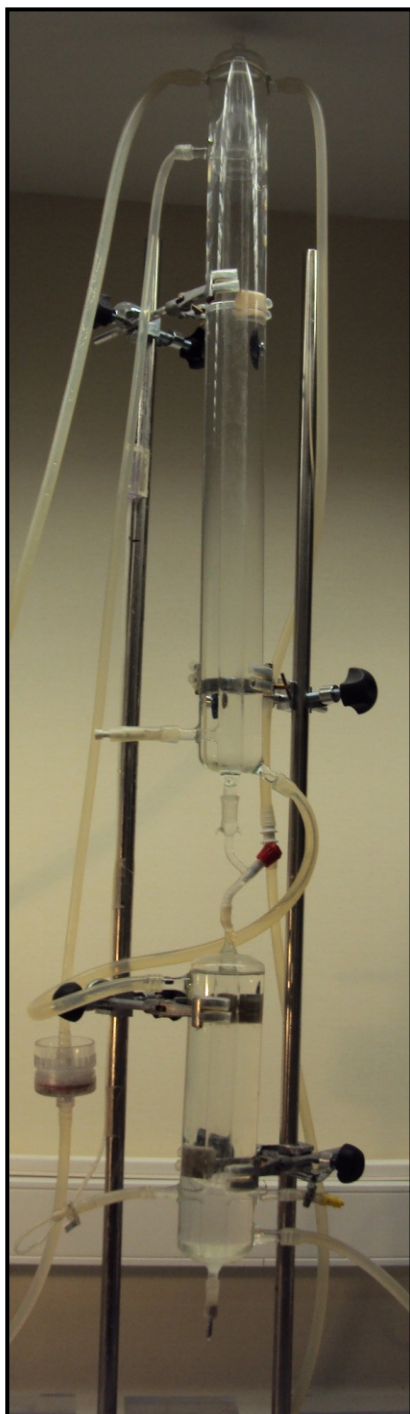


Figura 2.4. Sistema de cartografía MapTech®.

- Sistema de perfusión del corazón:

- Sistema de soporte metabólico tipo Langendorff (figura 2.5.). Este sistema permite la llegada al corazón del oxígeno y los nutrientes necesarios a través de la aorta ascendente. Se trata de una perfusión retrógrada hacia el sistema de vasos coronarios. Básicamente consta de una columna de vidrio, en la que por la parte central existe un conducto por donde circula la solución nutriente de Tyrode desde la parte superior de la columna hasta la cánula de perfusión conectada al



corazón a través de la aorta. Previamente, este líquido nutricio ha sido impulsado desde un depósito exterior, en el cual se realiza su oxigenación (con carbógeno) y ajuste del pH, hasta la parte más elevada de la columna de vidrio por medio de una bomba peristáltica. El conducto interno está en contacto permanente con una corriente de agua atemperada mediante un sistema regulador de la temperatura y que circula por un tubo que la envuelve (sistema de doble camisa) para que la solución de Tyrode alcance unos 37 °C, aproximadamente, antes de su llegada al corazón aislado. En la parte inferior del sistema tipo Langendorff, se ha dispuesto de un colateral para la administración de fármacos en la solución nutriente de Tyrode, en nuestro caso la solución de glibenclamida 1 mM. El sistema dispone de un filtro de partículas de 0,5 micras.

Figura 2.5. Sistema de perfusión del corazón tipo Langendorff.

- Bomba circulante de termostatación (Neslab Instruments, inc). Mantiene un flujo de agua caliente por un circuito que envuelve al conducto por donde fluye la solución Tyrode para atemperarla a 37 °C.



Figura 2.6. Bomba peristáltica.

- Bomba peristáltica (Cole-Parmer Instrument co.). Impulsa a una velocidad de flujo determinada y constante la solución Tyrode desde un recipiente reservorio, donde se oxigena, hasta la parte superior de la columna de soporte metabólico tipo Langendorff, previo paso por un filtro (figura 2.6.).

- Bomba de jeringa para anestesia P4000 IVAC. Para la perfusión de la solución de glibenclamida 1 mM a través del colateral de la columna de soporte metabólico tipo Langendorff (figura 2.7.).



Figura 2.7. Bomba P400 IVAC.

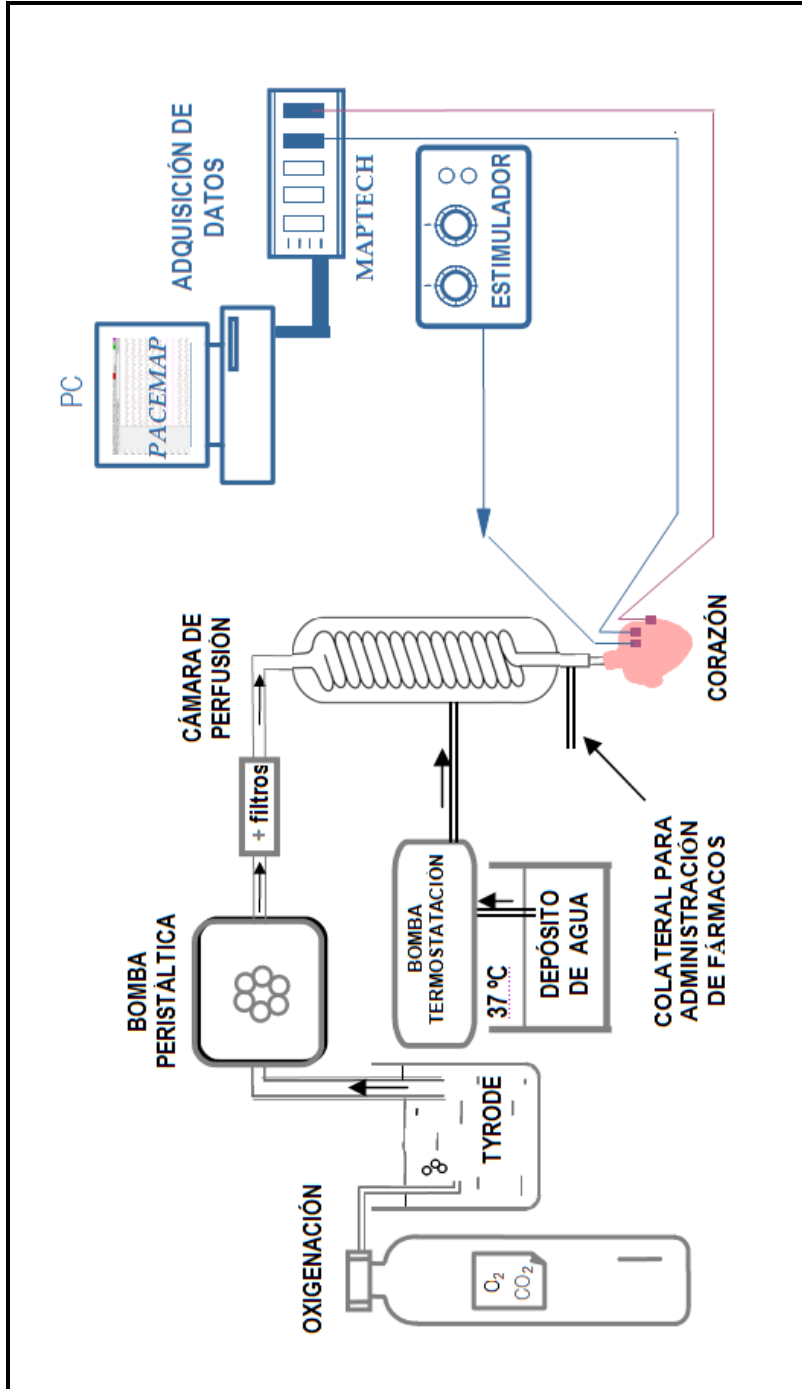


Figura 2.8. Esquema de la preparación de corazón aislado utilizada en el protocolo experimental de la presente tesis. En este esquema se puede apreciar la distribución de todos sus componentes.

2.1.4. Programas informáticos.

- PaceMap[®]. Utilizado para la captura de los electrogramas ventriculares, el marcaje de los momentos de activación de la señal fibrilatoria ventricular y el posterior análisis de los mismos para el estudio de diversos parámetros relacionados con la refractariedad y heterogeneidad miocárdica, así como la complejidad de la activación eléctrica durante la FV.
- MatLab[®] 7.6., en el que se programaron diversas aplicaciones para poder visualizar los trazados de los intervalos VV durante la FV y calcular los estadísticos, a partir de un fichero ASCII de marcas exportadas.
- MedMap 2.1. Desarrollado bajo entorno MatLab[®], utilizado fundamentalmente para la comprobación y validación de mapas y espectros de frecuencia de las señales de FV. Mediante ligeras modificaciones y ampliaciones de este programa se realizaron algunas correcciones y mejoras. Se le dotó de la capacidad de importar los archivos de señales generados por el programa PaceMap[®], se automatizó el cálculo de las frecuencias dominantes y concentraciones espectrales de los registros y se optimizó el cálculo estadístico por matrices de electrodos (figura 2.9.).
- SPSS[®] 19. Utilizado para la gestión y el análisis estadístico de los resultados obtenidos de los diferentes parámetros analizados en el presente estudio.

- Microsoft® Excel® 2003. Complementando al SPSS® 19 en la gestión y el análisis estadístico de los resultados obtenidos de los diferentes parámetros analizados en el presente estudio.
- Microsoft® Word® 2003. Soporte informático para la presente tesis tanto en su elaboración, almacenamiento y reproducción.

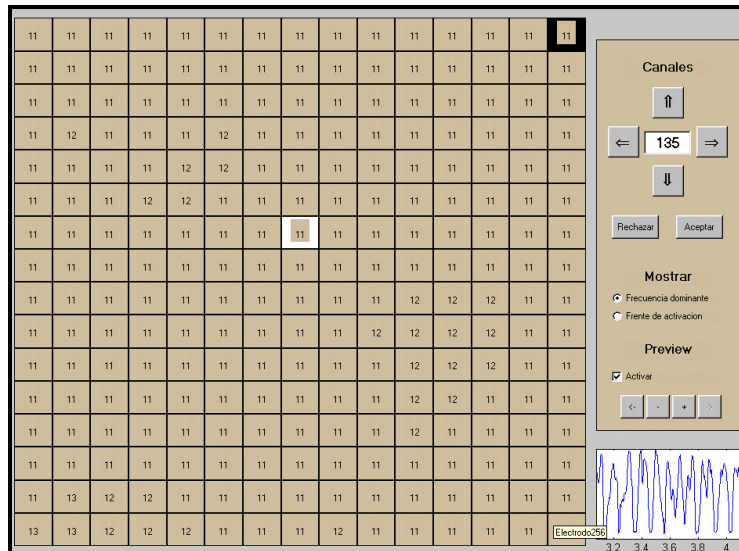


Figura 2.9. Aplicación MedMap, utilizado para la comprobación y validación de mapas y espectros de frecuencia de las señales de FV.

2.2. Métodos.

2.2.1. Condiciones de estabulación de los conejos.

Los conejos utilizados para el presente estudio fueron estabulados en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Las condiciones en las que permanecieron estabulados los conejos fueron controladas. Se les mantuvo con un fotoperiodo de luz artificial de 12 horas (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), a una temperatura aproximada de 21-23° C y con una humedad relativa del 31%. Cada conejo estuvo en una jaula individual de dimensiones reglamentarias, y se utilizó viruta de nogal Lignocel UBK 1500/3000 para mantenerlos en las condiciones de limpieza más adecuadas. Todos los animales estudiados fueron alimentados con pienso Global Diet 2030 Complete feed for Rabbits Harlan y agua *ad libitum*, registrándose diariamente las cantidades ingeridas por cada conejo y su peso como medida de control del estado de salud.

2.2.2. Protocolo de entrenamiento físico de los conejos.

La correcta realización de dicho protocolo de entrenamiento físico sobre la cinta rodante fue minuciosamente supervisada.

Previamente a iniciar las sesiones de entrenamiento, los conejos fueron sometidos a un periodo de 4 sesiones durante 1 semana para la familiarización con la cinta rodante.

Posteriormente, los conejos fueron sometidos a un protocolo de entrenamiento físico en cinta rodante de una duración de 6 semanas. Dicho protocolo consistió en 5 sesiones semanales consecutivas (30 sesiones en total). Cada sesión se compuso de 6 series de carrera continua, en cada una de las cuales el animal corrió a una velocidad de 20 m/min (0,33 m/s o 1,2 km/h) durante 4 minutos (80 m/sesión). El intervalo de descanso entre las series fue de 1 minuto. Aquellos

conejos que no realizaron adecuadamente dicho protocolo durante 5 sesiones consecutivas, una vez iniciado el periodo de entrenamiento, se excluyeron del presente estudio. Nada más finalizar el protocolo de entrenamiento se procedió con la eutanasia de los animales para realizar el estudio electrofisiológico.

Por otra parte, los conejos no sometidos al protocolo de entrenamiento físico (grupo control y grupo glibenclamida) permanecieron en las respectivas jaulas durante el mismo tiempo que duró dicho protocolo, esto es, 7 semanas.

2.2.3. Estudio electrofisiológico.

2.2.3.1. Preparación experimental.

Tras la heparinización con 800 UI de heparina sódica Rovi[®] al 5%, y anestesia intravenosa de los conejos con 12,5 mg/kg de ketamina Ketolar[®], a través de la vena marginal de la oreja, se sacrificaron mediante contusión cervical. Después de la eutanasia, por toracotomía mediosternal y pericardiotomía, se extrajo el corazón rápidamente, seccionándolo por su pedículo vascular, y se sumergió en una solución de Tyrode fría (1-5 °C) para reducir en lo posible el deterioro del corazón durante su manipulación previamente a su ubicación en el sistema de perfusión de tipo Langendorff.

Después de seccionar la arteria pulmonar y posteriormente disecar y seccionar también la arteria aorta ascendente, se conectó al sistema de Langendorff, mediante fijación por nudo con hilo de seda

de 1-2 mm de diámetro, perfundiendo retrógradamente al corazón con la solución de Tyrode a $37 \pm 0,5$ °C. El pH se mantuvo a 7,4. La oxigenación del mismo se efectuó con una mezcla del 95% de O₂ y un 5% de CO₂ (carbógeno). La presión de perfusión inicial se fijó en 60 mm de Hg. 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 al corte de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral, con el fin de hacerla insuficiente y permitir el escape de líquido por la aurícula izquierda, evitando así posibles acumulaciones de Tyrode en el ventrículo izquierdo, en el caso de que la válvula aórtica mostrara cierta incompetencia.

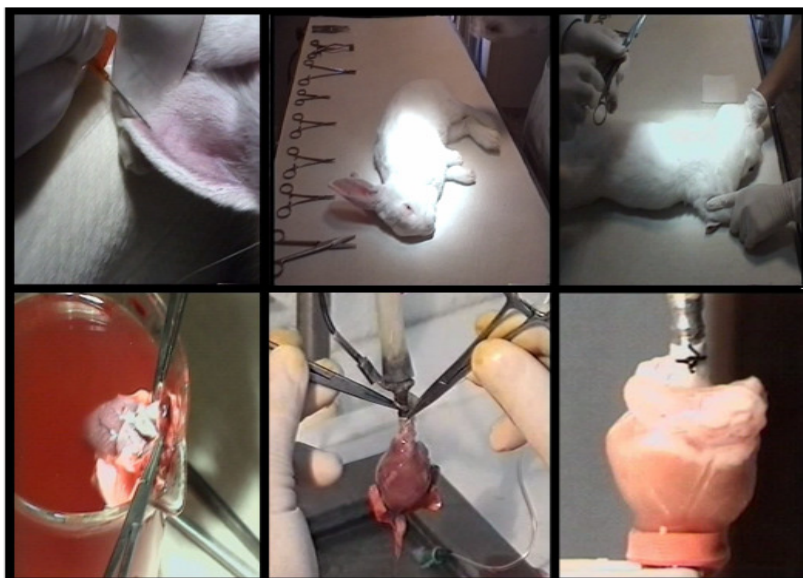


Figura 2.10. Distintos momentos de la preparación experimental. De izquierda a derecha, y de arriba abajo: anestesia a través de la vena marginal izquierda, animal anestesiado, momento previo a la extracción del corazón una vez está el animal sacrificado, corazón sumergido en baño de Tyrode frío, inserción de la aorta en la cánula del sistema, y corazón ya ubicado en el sistema.

A continuación se dispusieron diversos electrodos sobre la superficie del corazón aislado (figura 2.11.). Sobre la aurícula derecha se situaron un electrodo bipolar para la estimulación auricular y un electrodo bipolar para el registro electrográfico auricular. De igual modo, otro electrodo bipolar se ubicó en el ventrículo izquierdo para su estimulación. Para el registro de los electrogramas ventriculares, se ubicó sobre la superficie epicárdica de la pared libre del ventrículo izquierdo una placa multielectrodo de 256 electrodos unipolares de acero inoxidable. El electrodo indiferente consistió en una placa de Ag/AgCl de 4 x 6 mm situada sobre la aorta canulada, y que actuó como toma de tierra.

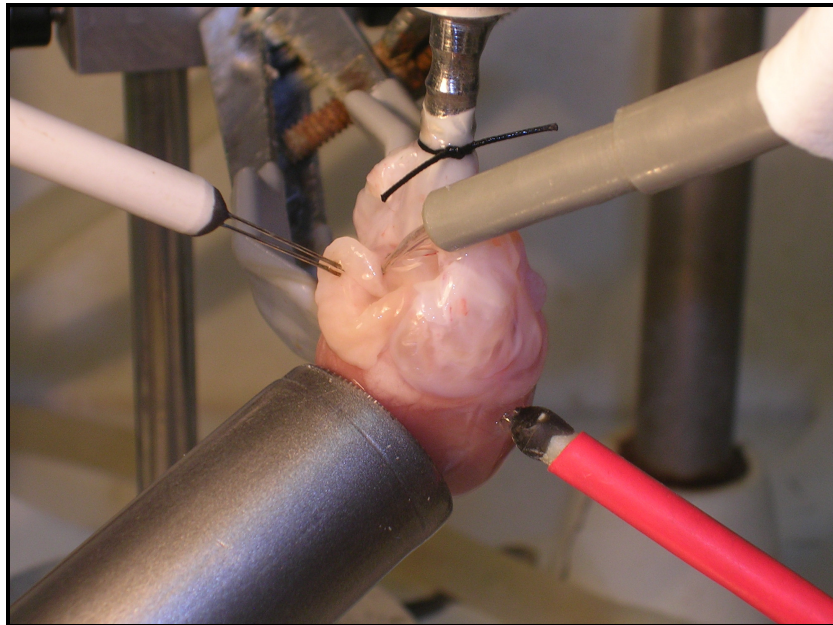


Figura 2.11. Ubicación de los diferentes electrodos sobre la superficie epicárdica cardíaca. Electrodo de registro auricular (parte superior izquierda). Placa multielectrodo de registro ventricular (parte inferior izquierda). Electrodo de estimulación auricular (parte superior derecha). Electrodo de estimulación ventricular (parte inferior derecha).

Finalmente, los electrodos de estimulación se conectaron a un estimulador Grass[®] S88 provisto de una unidad de aislamiento de estímulos. Los estímulos fueron rectangulares con una duración de 2 ms e intensidad doble del umbral diastólico. La adquisición, digitalización y grabación de los registros, como se ha comentado anteriormente, se realizó con un sistema de cartografía de la actividad eléctrica cardiaca MapTech[®], un ordenador con una tarjeta de adquisición de datos y el programa informático PaceMap[®], que permitió la monitorización de las señales durante el experimento y su posterior análisis para la obtención de los resultados del presente estudio.

2.2.3.2. Protocolo experimental.

Tras ubicar el corazón en el sistema de Langendorff y situar los electrodos correspondientes, tal y conforme se ha descrito anteriormente, y pasado un tiempo de estabilización de la preparación de 20 minutos, se procedió a la realización del siguiente protocolo en todos los grupos:

1. Estimación del flujo coronario. Para ello se recogió en un vaso de precipitados el Tyrode que drena desde la arteria pulmonar durante 1 minuto. Multiplicando el volumen de Tyrode recogido en 1 minuto por 60 (para extrapolarlo a 1 hora), obtenemos una aproximación del flujo coronario en ml/h.
2. Cálculo de la velocidad de infusión. Dividiendo entre 100 (factor de dilución empleado) el flujo coronario estimado previamente.

3. Determinación de umbrales de estimulación ventricular. Utilizando el estimulador Grass[®] S88. Con una frecuencia de estimulación constante a 4-5 pulsos por segundo y una duración del estímulo constante de 2 ms, se fue disminuyendo progresivamente la intensidad de estimulación hasta alcanzar el umbral. El protocolo se realizó estimulando con una intensidad doble del umbral diastólico.
4. Infusión de la solución de Tyrode (con DMSO) en la raíz aórtica (grupo control y entrenado) o de solución de glibenclamida 1mM (con un flujo 100 veces menor al del flujo coronario, para que llegue a coronaria a una concentración de 10 μ M), desde este punto hasta la finalización del protocolo.
5. Tras 10 minutos de infusión, inducción de la fibrilación ventricular mediante estimulación a frecuencias crecientes desde 4 a 20 Hz, manteniendo la perfusión coronaria durante la arritmia. La estimulación se efectuó incrementando lentamente la frecuencia, 0,1 Hz cada 3 segundos, hasta inducir la FV o perder la captura ventricular. Cuando no se desencadenaba la arritmia el procedimiento se repitió las veces necesarias hasta conseguirlo.
6. Una vez inducida la FV, durante un periodo de tiempo de 5 minutos y medio, y sin interrupción de la misma, se realizó un registro electrográfico continuo mediante el sistema de cartografía de actividad eléctrica cardíaca MapTech[®].

7. Pasados los 5 minutos y medio de FV, se procedió a ocluir la arteria coronaria circunfleja (ACC), pasando una aguja de sutura de seda trenzada a través del miocardio adyacente a la arteria a ocluir. La efectividad de la oclusión se comprobó mediante la observación del incremento de la presión registrada en la raíz aórtica mediante el manómetro de agua conectado lateralmente al sistema de Langendorff, así como por el desnivel del segmento S-T observado en los electrogramas ventriculares epicárdicos al final del experimento.
8. Posteriormente a la oclusión de la ACC se realizó un registro continuo de 5 minutos y medio de FV, y tras este tiempo, un registro de 10 segundos a los 6 minutos y uno de 10 segundos cada minuto hasta los 10 minutos.

2.2.3.3. Marcaje de los registros electrográficos.

El marcaje de los electrogramas ventriculares obtenidos durante el protocolo experimental se realizó con el programa PaceMap® mediante un proceso semiautomático de identificación de los momentos de pendiente máxima negativa (dv/dt), correspondientes a los momentos de activación de la FV. El umbral mínimo de este parámetro para ser considerado como una deflexión local es un porcentaje (20%) del máximo valor obtenido con cada electrodo. No obstante, el lugar de ubicación de la ventana del cursor ha sido escogido mediante la observación de los electrogramas ventriculares. Este proceso de marcado de la señal fibrilatoria, puede influir en el análisis de la FV en el dominio del tiempo que se ha realizado en el

presente trabajo. Por ello, ha sido conveniente que se establecieran unos criterios de marcaje definidos para que los resultados no estuviesen innecesariamente condicionados con la posible subjetividad intrínseca que dicho proceso pudiera entrañar.

En un primer lugar se ha procedido a eliminar los registros de todos los electrodos no operativos y de los registros defectuosos (figura 2.12.). Estas señales se han considerado “malas” porque incorporaban trazados correspondientes a artefactos generados por diversos tipos de manipulaciones y/o circunstancias, o bien porque eran de una muy baja amplitud al compararlas con el resto de los registros, o finalmente, porque no presentaban las características morfológicas adecuadas para identificar lo que se entiende por trazado propio de la activación eléctrica del miocardio ventricular.

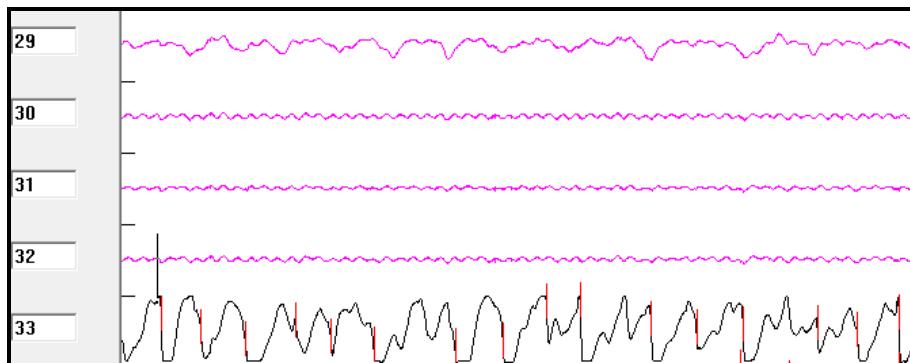


Figura 2.12. Registro electrográfico de FV visualizado con el programa PaceMap®. En color rosa se pueden ver los registros de los electrodos 29, 30, 31 y 32, eliminados por considerarse malas señales. Sin embargo, se puede apreciar en el electrodo 33 un trazado propio de FV, en el que se han identificado y marcado los momentos de activación.

A continuación, una vez desestimadas las señales consideradas como “malas”, se procedió a aplicar las marcas sobre los

electrogramas en registros de buena calidad, que fueron la mayor parte de los que se obtuvieron con los más de 200 electrodos útiles de la placa multielectrodo. Estas señales consideradas como “buenas” se caracterizan por un trazado propio de la activación eléctrica del miocardio ventricular, o sea, formado por señales con pendientes de despolarización y amplitudes adecuadas (figura 2.13.).

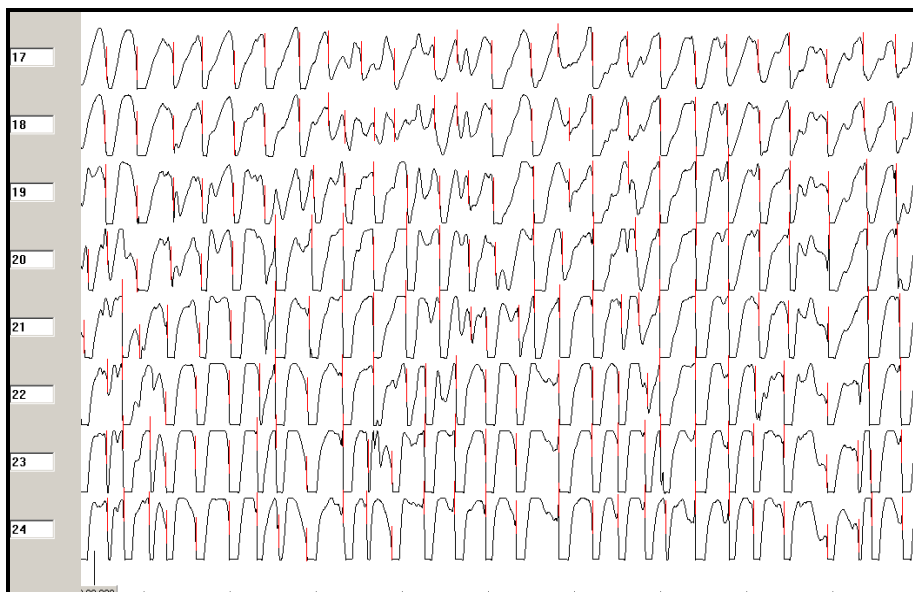


Figura 2.13. Programa PaceMap®, utilizado para la adquisición y registro de las señales eléctricas y posterior análisis. En rojo las marcas sobre los momentos con pendiente máxima negativa (dv/dt), o lo que es lo mismo, los momentos de activación de la señal fibrilatoria ventricular.

Por otra parte, de los registros de los electrodos no desestimados, se han encontrado algunos tramos con señales con pendientes de despolarización no muy definidas y de pequeña amplitud, pero que sí que se han considerado despolarizaciones ya que se ha podido observar que existía una clara progresión de los

electrodos anteriores o posteriores, por lo que se ha procedido a su marcaje (figura 2.14.).

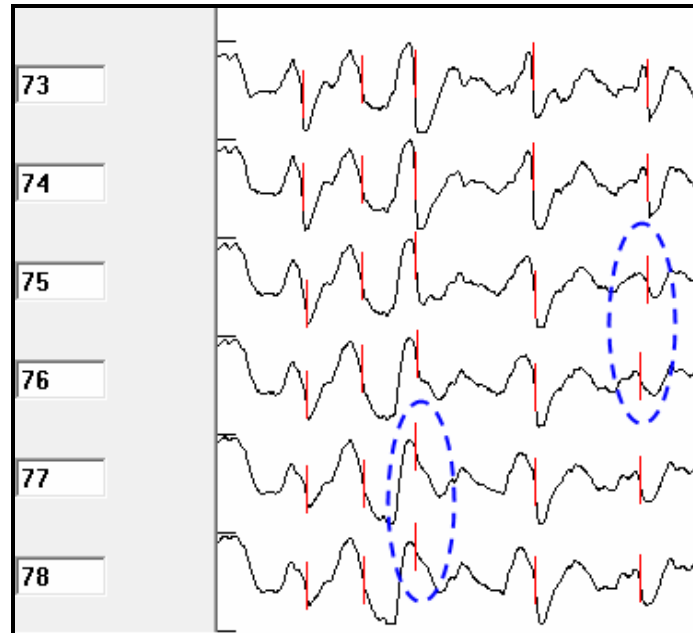
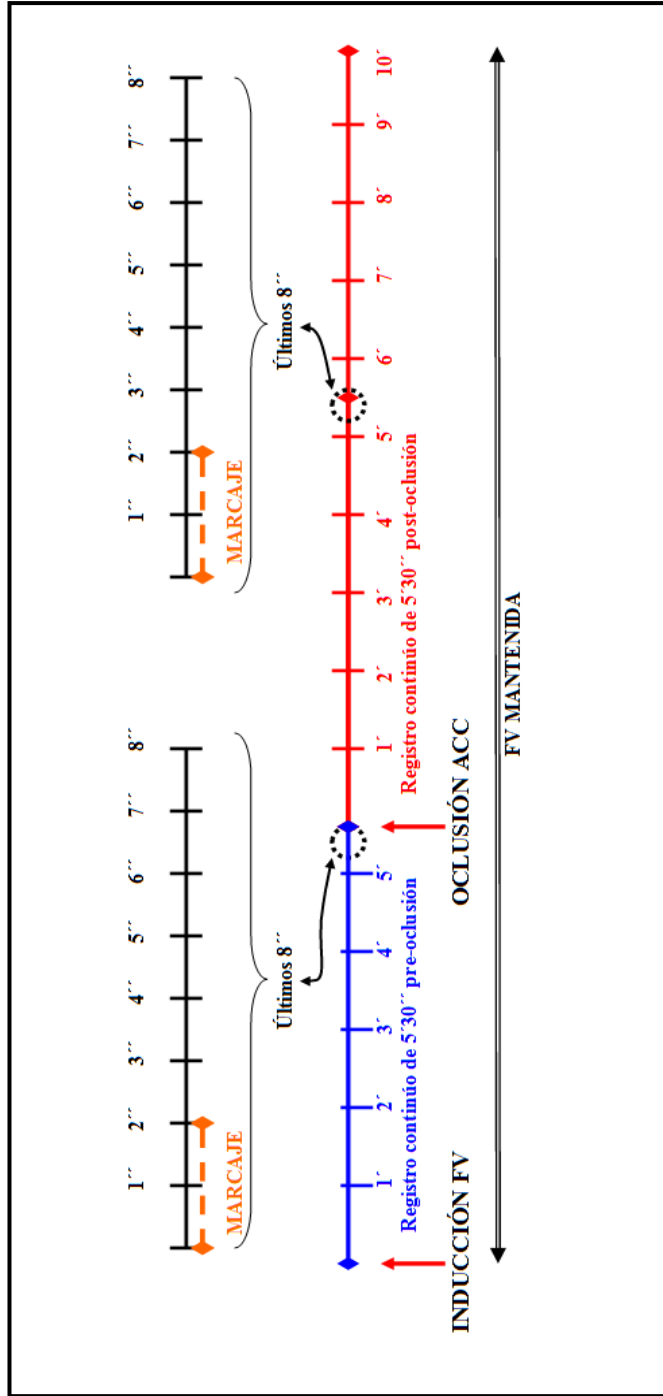


Figura 2.14. Marcaje de señales con pendientes de despolarización y amplitudes poco definidas. En círculo azul se destacan marcas efectuadas en tramos con pendientes poco pronunciadas, que se han considerado como despolarizaciones porque en electrodos contiguos en ese mismo instante existen pendientes bien definidas.

Finalmente, este marcaje se efectuó tanto en el registro continuo de 5 minutos y medio de FV previa oclusión de la ACC, como en el registro continuo de 5 minutos y medio de FV inmediatamente tras la oclusión de la ACC. De estos registros de FV, se cortaron los últimos 8 segundos, marcándose exactamente los momentos de activación de los 2 primeros segundos de FV registrados por cada uno de los más de 200 electrodos de la placa multielectrodo (esquema 2.1.).



Esquema 2.1. Esquema de los registros efectuados de la FV durante el protocolo experimental y ubicación temporal del marcaje efectuado en los momentos de activación de la señal fibrilatoria ventricular con el Programa Pacemap®.

2.2.3.4. Parámetros estudiados: definición y determinación de los mismos.

Tras finalizar el protocolo electrofisiológico y efectuar el marcaje semiautomático de los momentos de activación de los registros electrográficos obtenidos durante la FV, previamente y tras la oclusión coronaria, se procedió al estudio de la refractariedad miocárdica y la dispersión de la misma, como parámetros de heterogeneidad miocárdica, así como la complejidad de la activación eléctrica durante la FV como parámetro sobre el que se asientan diversas propiedades electrofisiológicas del miocardio. La isquemia regional aguda producida consecuentemente a la oclusión de la ACC no afecta a todo el tejido de igual manera. Este hecho se ha podido observar en los registros epicárdicos del miocardio ventricular que se han obtenido en cada grupo tras la oclusión de la ACC, en donde se pueden observar zonas de tejido sanas, zonas intermedias y zonas claramente más dañadas por la isquemia (figura 2.15.).

Tras la oclusión la ACC, se analizaron los parámetros estudiados en toda el área del epicardio cubierta por la placa multielectrodo, a la cual nos referimos como “post-oclusión (A)”, y en la zona de mayor deterioro producido por la oclusión, a la cual nos referimos como “post-oclusión (B)”. Decimos en la zona más claramente afectada por la oclusión coronaria, a una zona acotada, cubierta por 25 electrodos en todos los casos, y en los que la morfología electrográfica de la señal fibrilatoria es la más propia de deterioro (figura 2.16.).

En experimentos previos ya analizamos la correspondencia entre el electrograma en ritmo sinusal y sus características propias de lesión (máximo grado de desnivel del segmento S-T), y un determinado tipo de trazado fibrilatorio (registros electrográficos caracterizados por intervalos VV muy amplios, y de forma “polidentada” que finalizan con una prominente pendiente de potencial muy negativo).

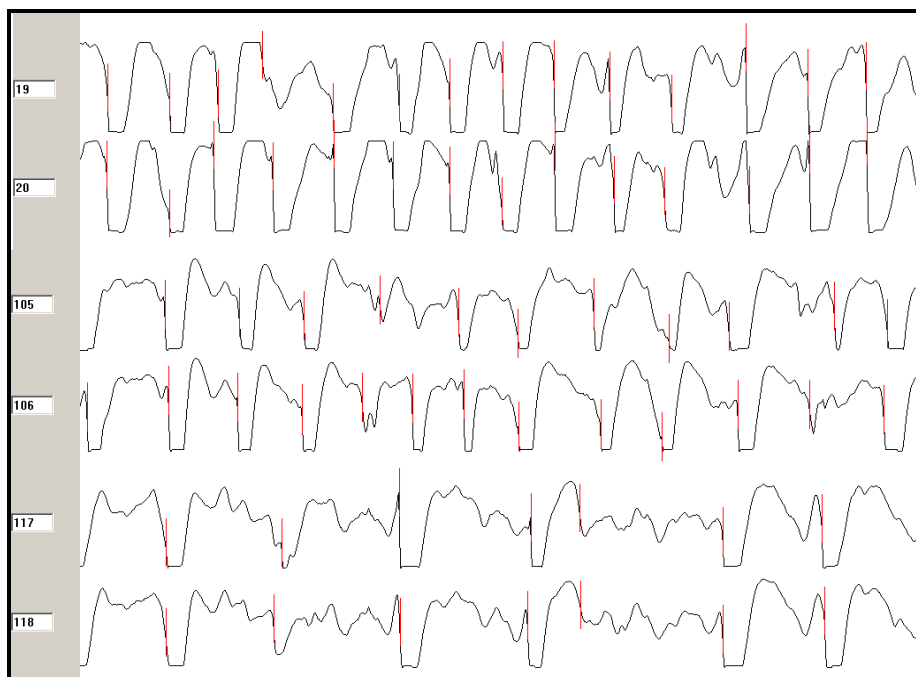


Figura 2.15. Registro epicárdico de miocardio ventricular tras la oclusión de la ACC. En él se pueden apreciar las diferentes zonas, con su diferente grado de lesión isquémica. En los electrodos 19 y 20 se puede observar un registro típico de FV perteneciente a una zona sana del epicárdio ventricular. En los electrodos 105 y 106, ya se puede ir viendo como los complejos se van ensanchando (los intervalos VV se amplían) y algunos complejos tienen forma “bidentada”. Este tipo de registro es típico de zonas intermedias. Por último, en los electrodos 117 y 118 se puede observar un registro de FV característico de una zona muy deteriorada por la isquémica, en donde los intervalos VV se han ensanchado considerablemente y las señales tienen una forma habitual “polidentada” que finaliza con una prominente pendiente de potencial muy negativo.

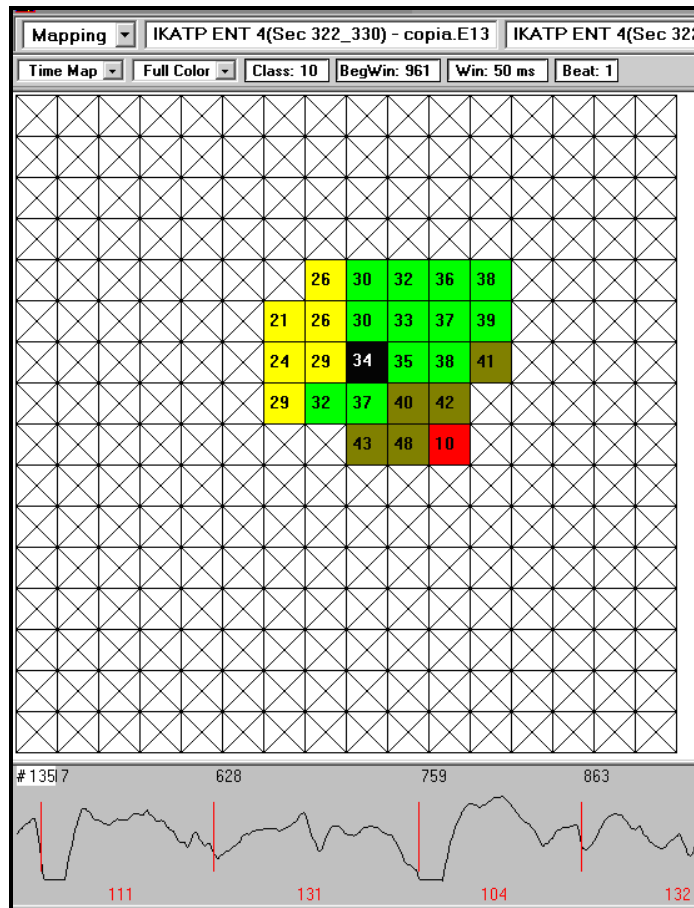


Figura 2.16. Delimitación de la zona de mayor deterioro por la isquémica. Se puede observar como se han inhabilitado (celdas con X) aquellos electrodos que no se ubican en zonas claramente isquémicas. En la parte inferior figura el registro de FV de uno de los electrodos ubicados en la zona isquémica, con su morfología característica.

- **Longitud del ciclo durante la fibrilación ventricular y la dispersión del mismo.**

El intervalo VV se define como el periodo de tiempo (en ms) entre dos activaciones ventriculares consecutivas durante la FV. Por lo tanto, tras el marcaje de 2 segundos de cada registro de FV obtenido

por cada uno de los electrodos de la placa multielectrodo para cada experimento, previa oclusión coronaria y tras la misma, quedan definidos los intervalos VV (figura 2.17.).

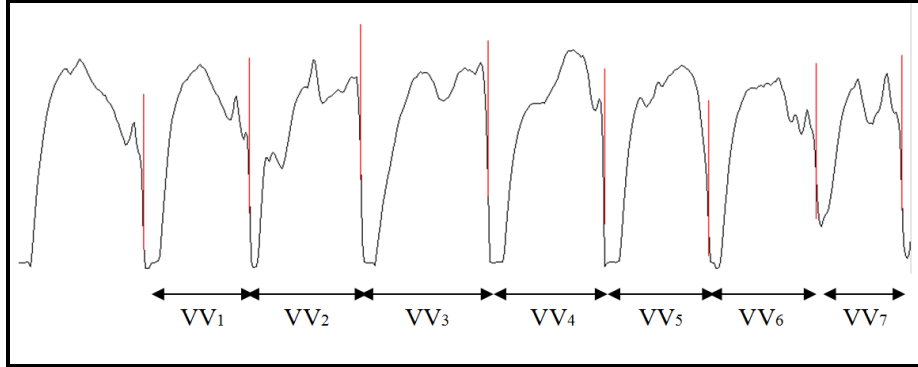


Figura 2.17. Registro electrográfico de FV en el que se pueden apreciar las marcas efectuadas sobre los momentos de activación del proceso fibrilatorio, y consecuentemente los intervalos VV entre dichos momentos.

Se realizó el estudio de la distribución de los intervalos VV de cada experimento, previa oclusión de la ACC y tras la oclusión de la misma (figura 2.18.). En el eje de abscisas se representa la duración en ms de cada intervalo VV (t). En el eje de ordenadas se halla el número de intervalos VV (N) que presentan dicha duración. Al lado de cada distribución de intervalos VV se aprecia un recuadro en donde figuran la mediana de cada distribución, así como el número total de intervalos VV (N) que existen en cada segmento de 2 segundos de FV registrado por cada uno de los más de 200 electrodos unipolares de la placa multielectrodo.

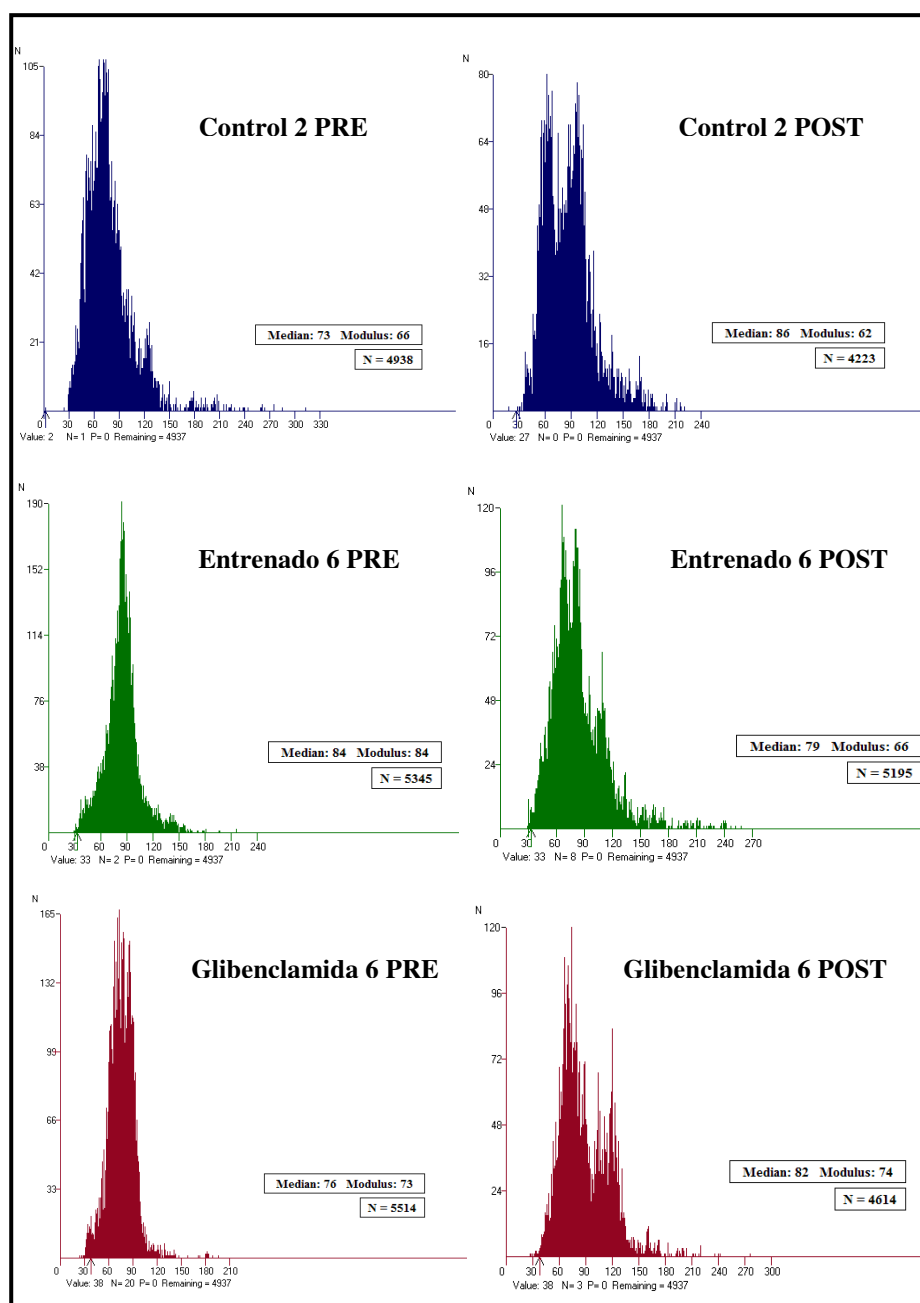


Figura 2.18. Ejemplos de distribuciones de los intervalos VV del grupo control, entrenado y tratado con glibenclamida, antes y después de ocluir la ACC.

En un primer lugar, se obtuvo en cada experimento de cada grupo, previa oclusión de la ACC y tras la oclusión de la ACC, la media ($M_{VV.Exp}$) de los intervalos VV (ecuación 2.1.), su desviación estándar ($Stdv_{VV.Exp}$) y el coeficiente de variación ($CV_{VV.Exp}$), cociente entre las $Stdv_{VV}$ y M_{VV} (ecuación 2.2.), de los intervalos VV.

$$M_{VV\ Exp} = \frac{VV_1 + VV_2 + VV_3 + \dots + VV_n}{N_{VV}}$$

Ecuación 2.1. Representa el valor medio de intervalo VV (en ms) para un experimento concreto. Se obtiene del cociente entre el sumatorio de todos los valores de intervalos VV presentes en la totalidad del registro marcado y en número total de intervalos VV obtenidos (N_{VV}).

$$CV_{VV\ Exp} = \frac{Stdv_{VV\ Exp}}{M_{VV\ Exp}} \times 100$$

Ecuación 2.2. CV del intervalo VV medio obtenido en cada experimento.

A continuación, se obtuvieron la media de estos parámetros para cada grupo, antes de la oclusión de la ACC y tras la oclusión de la ACC. Por ejemplo, para el grupo control se procedió de la siguiente manera:

Experimento	M_{VV.Exp}	Stdv_{VV.Exp}	CV_{VV.Exp}
Control 1	M _{VV.Cont1}	Stdv _{VV.Cont1}	CV _{VV.Cont1}
Control 2	M _{VV.Cont2}	Stdv _{VV.Cont2}	CV _{VV.Cont2}
Control 3	M _{VV.Cont3}	Stdv _{VV.Cont3}	CV _{VV.Cont3}
...
Control n	M _{VV.Contn}	Stdv _{VV.Contn}	CV _{VV.Contn}
MEDIA GRUPO	M_{VV CONT}		M_{CV VV CONT}

Donde el valor medio del intervalo VV para el grupo control (**M_{VV CONT}**) fue la media de los valores medios de los intervalos VV de cada experimento de dicho grupo (M_{VV.Contn}) (ecuación 2.3.). Y donde el CV medio para el grupo control (**M_{CV VV CONT}**) fue la media de los CV de los intervalos VV de cada experimento dicho grupo (CV_{VV.Contn}) (ecuación 2.4.). Los parámetros descritos, y ejemplarizados en el grupo control, se calcularon para el grupo entrenado y para el grupo tratado con el bloqueante de los canales K_{ATP}, antes de la oclusión de la ACC y tras la oclusión de la ACC.

$$M_{VV \text{ CONT}} = \frac{M_{VV.Cont1} + M_{VV.Cont2} + M_{VV.Cont3} + \dots + M_{VV.Contn}}{N_{\text{CONT}}}$$

Ecuación 2.3. Intervalo VV medio (en ms) para el grupo control. Se obtiene del cociente entre el sumatorio de todos los valores de intervalos VV medios de cada experimento del grupo control y el número de experimentos válidos de dicho grupo (N_{CONT}).

$$M_{CV\ VV\ CONT} = \frac{CV_{VV.Cont1} + CV_{VV.Cont2} + CV_{VV.Cont3} + \dots + CV_{VV.Contn}}{N_{CONT}}$$

Ecuación 2.4. CV del intervalo VV medio obtenido en el grupo control. N_{CONT} es el número de experimentos válidos de dicho grupo.

Asimismo, se obtuvo el valor de la mediana de la distribución de todos los intervalos VV para cada experimento de. Obteniéndose a continuación el valor medio por grupo (Mn_{VV}), previamente a la oclusión de la ACC y tras la misma.

- **Periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular y la dispersión del mismo.**

Para la aproximación en cada registro electrográfico al periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular (PRFFV), intervalo más corto que separa dos respuestas normalmente propagadas durante la FV, se puede utilizar el percentil 5 (P5) de la distribución normal de todos los intervalos VV (Duytschaever et al., 2001). En este sentido, el PRFFV o P5 representa la probabilidad de obtener una puntuación típica inferior a un valor $z = -1,64$. O lo que es lo mismo, en una distribución normal de los intervalos VV, el valor (en ms) por debajo del cual quedan englobados el 5% de todos los intervalos VV (figura 2.19.). Se procedió a la determinación del PRFFV de cada registro electrográfico realizado por cada uno de los más de 200 electrodos de la placa multielectrodo ($PRFFV_i$), siendo el valor del $PRFFV_i$ una aproximación al P5 de la distribución de intervalos VV obtenidos en cada uno de estos electrodos (figura 2.20.).

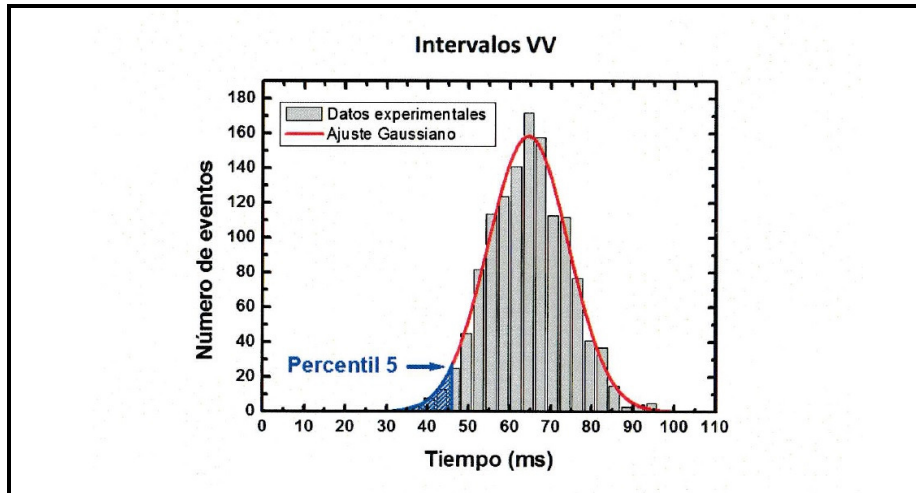


Figura 2.19. Distribución gaussiana a partir de los intervalos VV durante la FV. El P5 corresponde al área sombreada en azul bajo la línea de ajuste gaussiano. Tomado de Brines, 2014.

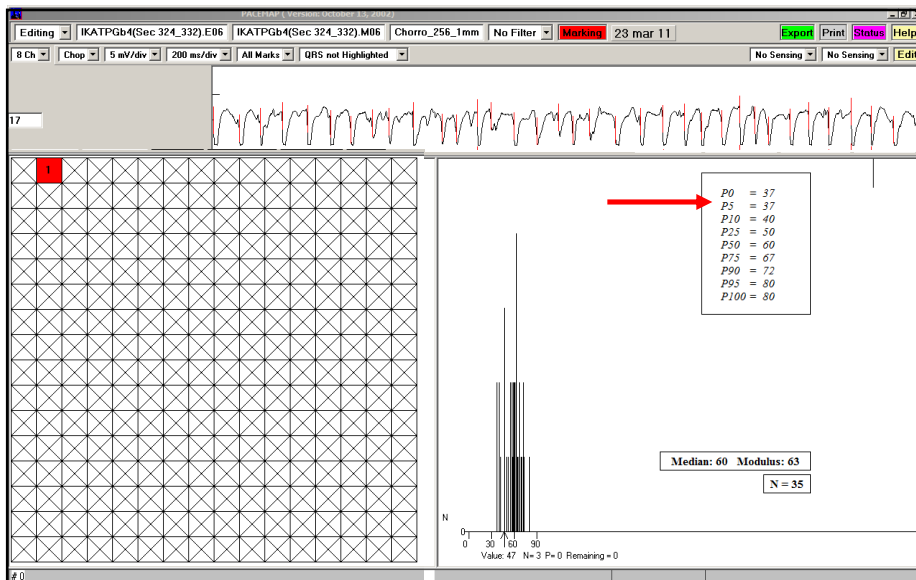


Figura 2.20. **Parte superior:** Registro electrográfico de la FV efectuado por el electrodo número 17 de la placa multielectrodo, en el que se pueden apreciar las marcas efectuadas sobre los momentos de activación del proceso fibrilatorio. **Parte inferior izquierda:** Placa multielectrodo en la que se han inhabilitado todos los electrodos exceptuando el electrodo 17 para el cálculo del PRFFV en dicho punto del epicardio ventricular. **Parte inferior derecha:** Distribución de los intervalos VV del electrodo 17 y valor del PRFFV en este punto del epicardio ventricular.

El obtener un valor de P5 o PRFFV en cada uno de los registros realizado por cada uno de los electrodos ($PRFFV_i$) permitió obtener una media de éste parámetro (ecuación 2.5.), que se correspondía con el valor del PRFFV para cada experimento ($PRFFV_{Exp}$), su desviación estándar ($Stdv_{PRFFV,Exp}$) y, consecuentemente, su CV ($CV_{PRFFV,Exp}$) (ecuación 2.6.), que caracteriza la dispersión o heterogeneidad del PRFFV en la zona epicárdica del miocardio ventricular que se ha realizado el registro. Estos parámetros se obtuvieron, en cada experimento, antes y después de ocluir la ACC.

$$PRFFV_{Exp} = \frac{PRFFV_1 + PRFFV_2 + PRFFV_3 + \dots + PRFFV_n}{N_{ELEC}}$$

Ecuación 2.5. Representa el valor medio del PRFFV (en ms) para un experimento concreto, obtenido del cociente entre el sumatorio de todos los PRFFV obtenidos por cada electrodo de la placa multielectrodo y el número total de electrodos (N_{ELEC}).

$$CV_{PRFFV,Exp} = \frac{Stdv_{PRFFV,Exp}}{PRFFV_{Exp}} \times 100$$

Ecuación 2.6. CV del PRFFV medio obtenido en cada experimento.

A continuación, se obtuvieron la media de estos parámetros para cada grupo, antes de la oclusión de la ACC y tras la oclusión de la ACC. Por ejemplo, para el grupo control se procedió de la siguiente manera:

Experimento	PRFFV_{Exp}	Stdv_{PRFFV.Exp}	CV_{PRFFV.Exp}
Control 1	PRFFV _{Cont1}	Stdv _{PRFFV.Cont1}	CV _{PRFFV.Cont1}
Control 2	PRFFV _{Cont2}	Stdv _{PRFFV.Cont2}	CV _{PRFFV.Cont2}
Control 3	PRFFV _{Cont3}	Stdv _{PRFFV.Cont3}	CV _{PRFFV.Cont3}
...
Control n	PRFFV _{Contn}	Stdv _{PRFFV.Contn}	CV _{PRFFV.Contn}
MEDIA GRUPO	PRFFV_{CONT}		CV_{PRFFV CONT}

Donde el valor medio del PRFFV para el grupo control (**PRFFV_{CONT}**) fue la media de los valores medios de los PRFFV de cada experimento de dicho grupo (PRFFV_{Contn}) (ecuación 2.7.). Y donde el CV medio para el grupo control (**CV_{PRFFV CONT}**) fue la media de los CV de los PRFFV de cada experimento de dicho grupo (CV_{PRFFV.Contn}) (ecuación 2.8.).

$$PRFFV_{CONT} = \frac{PRFFV_{Cont1} + PRFFV_{Cont2} + PRFFV_{Cont3} + \dots + PRFFV_{Contn}}{N_{CONT}}$$

Ecuación 2.7. PRFFV (en ms) para el grupo control. Se obtiene del cociente entre el sumatorio de todos los valores PRFFV de cada experimento del grupo control y el número de experimentos válidos de dicho grupo (N_{CONT}).

$$CV_{PRFFV CONT} = \frac{CV_{PRFFV.Cont1} + CV_{PRFFV.Cont2} + \dots + CV_{PRFFV.Contn}}{N_{CONT}}$$

Ecuación 2.8. CV del PRFFV medio obtenido en el grupo control. N_{CONT} es el número de experimentos válidos de dicho grupo.

Los parámetros descritos anteriormente, y ejemplarizados en el grupo control, se calcularon para el grupo entrenado y para el grupo tratado con el bloqueante de los canales K_{ATP} , antes y después de la oclusión de la ACC.

- **Dispersión de la frecuencia dominante durante la fibrilación ventricular.**

La frecuencia dominante durante la fibrilación ventricular, es, tras la descomposición por la transformada de Fourier de la fibrilación ventricular en sus infinitos armónicos, la senoide que coincide con aquél armónico que posee la mayor amplitud. El análisis espectral de la fibrilación ventricular se efectuó utilizando bloques de datos de 2048 puntos, aplicando la *ventana de Hamming*. Se obtuvo para cada bloque la frecuencia dominante.

La frecuencia dominante media (FDM) es la media de las frecuencias dominantes registradas por todos los electrodos unipolares de la placa multielectrodo en un tiempo determinado de la fibrilación ventricular. Para este análisis se ha utilizado el método de Welch, que se basa en los estudios clásicos de Fourier sobre los armónicos constituyentes de una onda compuesta. El procesamiento de datos fue efectuado mediante el programa informático MatLab[®] 7.6 dentro de la aplicación MedMap (figura 2.21.).

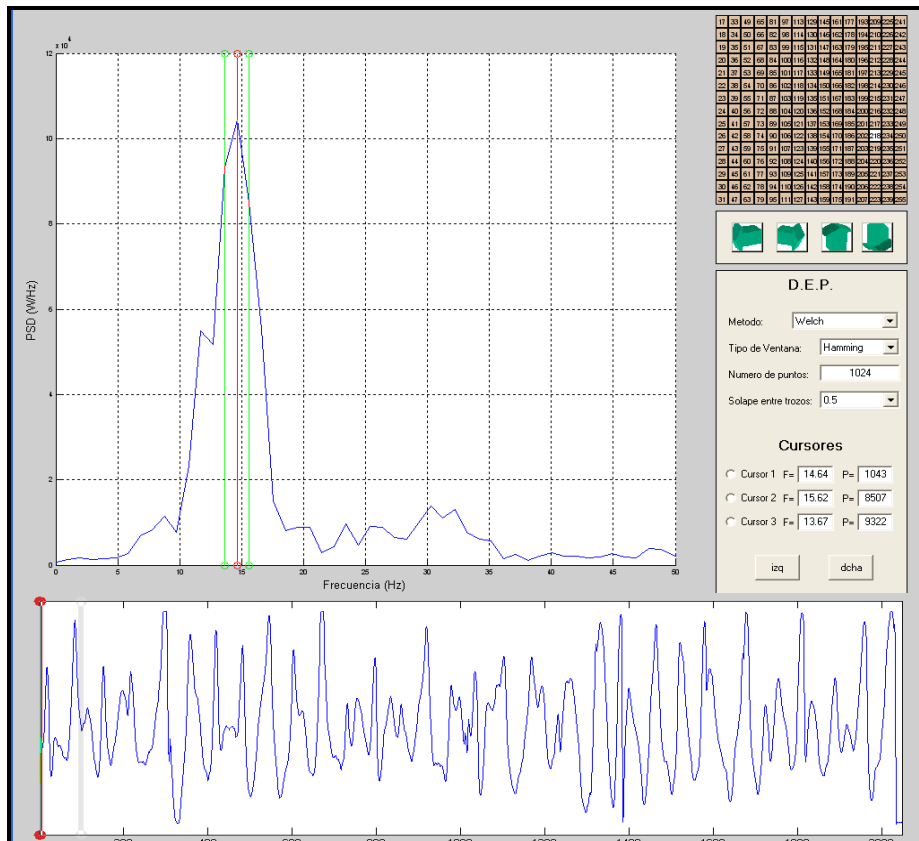


Figura 2.21. Detalle del programa MatLab® dentro de la aplicación MedMap. **Parte superior:** Representación de la densidad de potencia espectral frente a la amplitud del trazado de FV. En ordenadas se representa la densidad espectral de potencia (en W/Hz) y en abscisas los valores de FD (en Hz). **Parte inferior:** Registro de la fibrilación ventricular analizado.

En cada experimento, a partir de la FDM y de su desviación estándar, se calculó el coeficiente de variación de la frecuencia dominante ($CV_{FD,Exp}$) (ecuación 2.9.), previamente a la oclusión de la ACC y después de ocluirla. Este parámetro caracteriza a la dispersión o heterogeneidad de la frecuencia dominante durante la fibrilación en la zona epicárdica del miocardio ventricular que se ha realizado el registro electrográfico.

$$CV_{FD\text{Exp}} = \frac{Stdv_{FD\text{Exp}}}{FDM_{Exp}} \times 100$$

Ecuación 2.9. CV de la FDM obtenido en cada experimento.

A continuación, se obtuvo la media de este parámetro para cada grupo, antes de la oclusión de la ACC y tras la oclusión de la misma. Por ejemplo, para el grupo control se procedió de la siguiente manera:

Experimento	FDM_{Exp}	Stdv_{FD.Exp}	CV_{FD.Exp}
Control 1	FDM _{Cont1}	Stdv _{FD.Cont1}	CV _{FD.Cont1}
Control 2	FDM _{Cont2}	Stdv _{FD.Cont2}	CV _{FD.Cont2}
Control 3	FDM _{Cont3}	Stdv _{FD.Cont3}	CV _{FD.Cont3}
...
Control n	FDM _{Contn}	Stdv _{FD.Contn}	CV _{FD.Contn}
MEDIA GRUPO			CV_{FD CONT}

Donde el valor medio del CV de la FD para el grupo control (**CV_{FD CONT}**) fue la media de los CV de las FD de cada experimento de dicho grupo (CV_{FD.Contn}) (ecuación 2.10.).

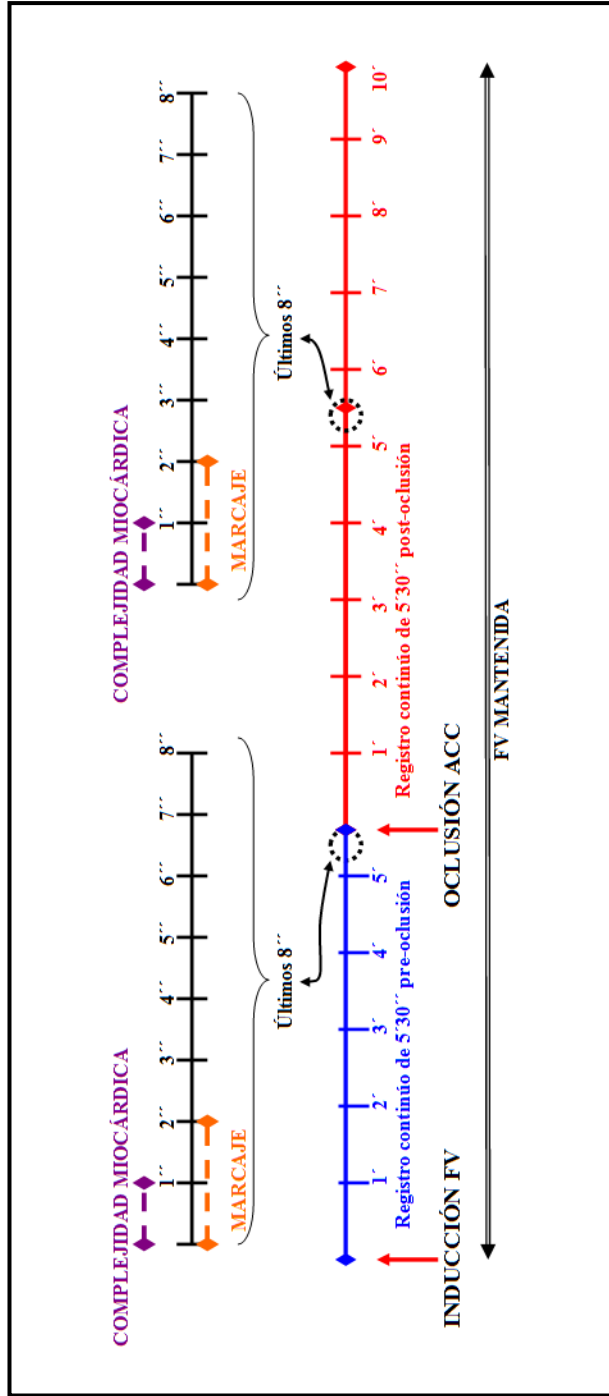
$$CV_{FD\text{CONT}} = \frac{CV_{FD.Cont1} + CV_{FD.Cont2} + \dots + CV_{FD.Contn}}{N_{CONT}}$$

Ecuación 2.10. CV de la FD obtenido en el grupo control. N_{CONT} es el número de experimentos válidos de dicho grupo.

Los parámetros descritos anteriormente, y ejemplarizados en el grupo control, se calcularon para el grupo entrenado y para el grupo tratado con el bloqueante de los canales K_{ATP} , antes y después de la oclusión de la ACC.

- **Complejidad de la activación miocárdica durante la fibrilación ventricular.**

Así como los anteriores parámetros resultantes del análisis de la fibrilación ventricular en el dominio del tiempo se han estudiado en un intervalo concreto de 2 segundos, previo a la oclusión de la ACC y tras su oclusión (ver esquema 2.1.), el estudio de la complejidad de la activación miocárdica durante la FV se ha realizado durante el primer segundo (esquema 2.2.). Cada segmento de 1 segundo analizado se ha dividido en 11 ventanas de tiempo de 50 ms consecutivas (entre una y otra hay alrededor de 100 ms). En cada ventana de tiempo analizada de 50 ms, ubicada en un instante concreto del registro de la fibrilación ventricular, se han podido visualizar, por medio del programa PaceMap[®], los tiempos de activación correspondientes a cada electrodo de la placa multielectrodo. PaceMap[®] permite que los diferentes electrodos aparezcan codificados de diversos colores acorde al tiempo de activación correspondiente. Los tiempos de activación de cada electrodo hacen referencia a los intervalos de tiempo que hay entre el inicio de la ventana (fijada en un momento concreto del registro de la FV) y las marcas efectuadas sobre los momentos de activación en los registros de cada electrodo (figura 2.22.). Los diferentes tiempos de activación se establecen respecto al del electrodo que más prematuramente recoge la señal.



Esquema 2.2. Esquema de los registros efectuados de la FV durante el protocolo experimental y ubicación temporal del análisis de la complejidad de la activación miocárdica de la FV. El marcaje de los registros electrográficos ventriculares se han realizado en un intervalo de tiempo de 2 segundos. Sin embargo, la construcción de los mapas de activación se ha realizado sólo en el primer segundo.

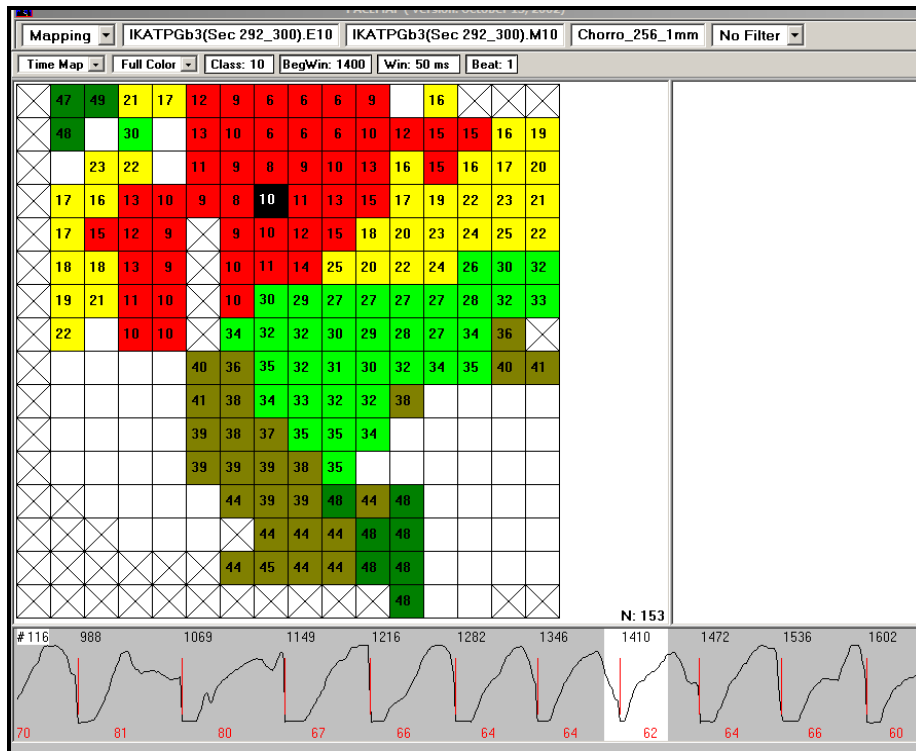


Figura 2.22. Matriz de electrodos de PaceMap® con los tiempos de activación y su codificación en color. A modo de ejemplo, el electrodo en negro tiene un tiempo de activación de 10 ms, ya que hay un intervalo de 10 ms entre el inicio de la ventana blanca de la banda inferior horizontal y la marca en rojo efectuada sobre el momento de activación registrado por dicho electrodo en ese instante de tiempo concreto (parte inferior derecha de la imagen). Los tiempos de activación varían en los electrodos contiguos (8, 9, 10, 12 ms) ya que la ventana se encuentra fija en el mismo instante de tiempo, sin embargo, las marcas correspondientes a los momentos de mayor pendiente no se sitúan en el mismo instante de tiempo que la marca del electrodo negro.

Asimismo, el programa PaceMap® permite ver las diferentes progresiones en los tiempos de activación en movimiento con la opción de “movie”. Con el análisis, en cada ventana de 50 ms, de los tiempos de activación detectados por cada electrodo, su visualización en color, y con la ayuda de la herramienta “movie”, se han elaborado los mapas de activación, identificando la existencia de diferentes

patrones de activación, tales como frentes simples (figura 2.23.), colisiones de frentes simples (figura 2.24.), reentradas (figura 2.25.), afloramientos (figura 2.26.) y torsiones (figura 2.27.).

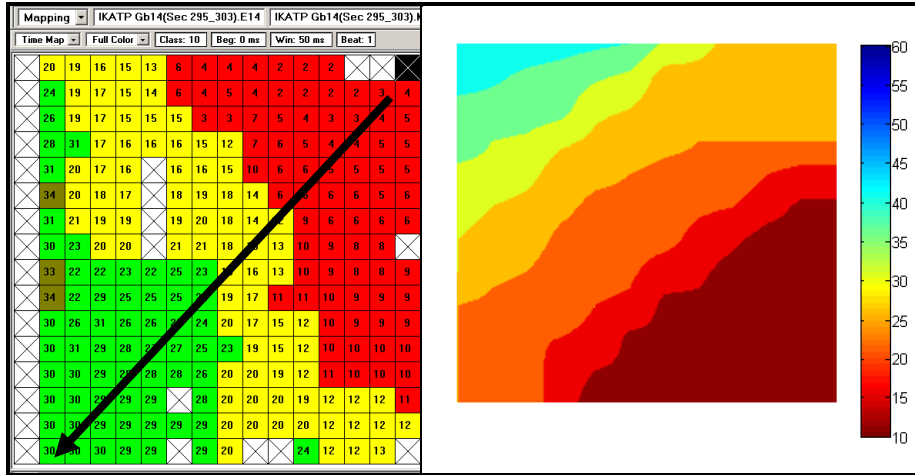


Figura 2.23. Parte izquierda: Matriz de electrodos de PaceMap[®] con los tiempos de activación (en ms) detectados por cada electrodo, codificados en color, que permite identificar un frente simple. **Parte derecha:** Imagen suavizada de un mapa correspondiente a un frente simple, con su escala de tiempo (en ms) codificada en color (tomado de Díaz, 2012).

Si se observa en el registro la presencia de dos o más frentes de onda que no describen del todo trayectorias independientes entre si, sino que en algún punto de sus recorridos se encuentran uno frente al otro por desplazarse en la misma dirección pero en sentido contrario, se habla de colisión o choque de frentes de onda. Dicha colisión de frentes de onda, puede ser frontal o lateral. Hablamos de colisión frontal (figura 2.24.) si ambos frentes se encuentran en su trayectoria uno frente al otro. La colisión lateral sería en el caso de que dos frentes de onda viajen en la misma dirección uno al lado del otro y que en el tiempo se fusionen por su cercanía entre sí.

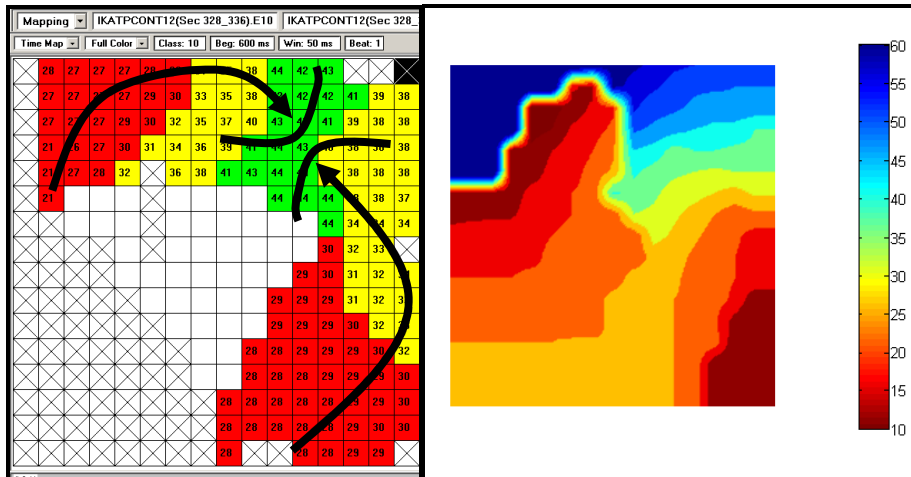


Figura 2.24. Parte izquierda: Matriz de electrodos de PaceMap[®] con tiempos de activación (en ms) detectados por cada electrodo, codificados en color, que permite identificar dos frentes simples que colisionan frontalmente. Parte derecha: Imagen suavizada de un mapa correspondiente a dos frentes simples que colisionan frontalmente, con su escala de tiempo (en ms) codificada en color (tomado de Díaz, 2012).

En el caso de las reentradas (figura 2.25.), se establece que hay una cuando el frente de activación, tras describir una trayectoria circular o elíptica, vuelve a activar la zona donde se ha iniciado dicho frente. Solamente se considera como activación reentrante a aquella en la que se produce al menos un giro completo, es decir, aquellos casos en los que el proceso de activación vuelve a activar la zona previamente activada por el mismo frente (reentrada completa). Para confirmar que la activación corresponde efectivamente a un proceso reentrante, se desplaza sucesivamente la ventana del cursor unos milisegundos previos y unos milisegundos posteriores al intervalo de tiempo analizado.

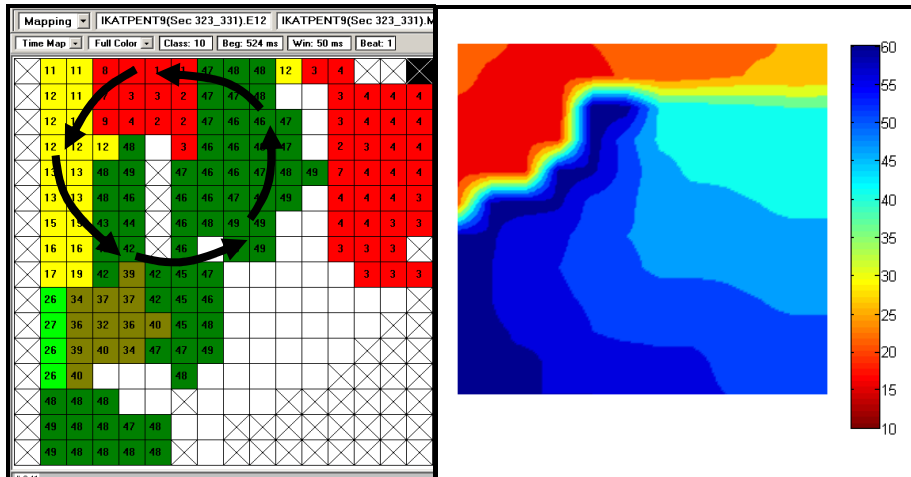


Figura 2.25. Parte izquierda: Matriz de electrodos de PaceMap[®] con tiempos de activación (en ms) detectados por cada electrodo, codificados en color, que permite identificar una reentrada. Parte derecha: Imagen suavizada de un mapa correspondiente a una reentrada, con su escala de tiempo (en ms) codificada en color (tomado de Díaz, 2012).

En el caso del afloramiento (figura 2.26.), que en el mapa de activación se muestra como una zona de activación “aislada”, es consecuencia de un estímulo proveniente de zonas subepicárdicas. Se debe observar si no hay algún frente de onda circundante a la zona que pudiera provocar una despolarización secundaria de dichas células para poder confirmar claramente que se trata de un afloramiento.

Asimismo, se puede hallar una torsión de un frente de onda (figura 2.27.). Se trata de un frente simple o único que realiza un giro o curva en sentido circular o elíptico pero que no termina de completar dicho recorrido, por lo que visualmente hace que tenga la apariencia de una “reentrada incompleta”.

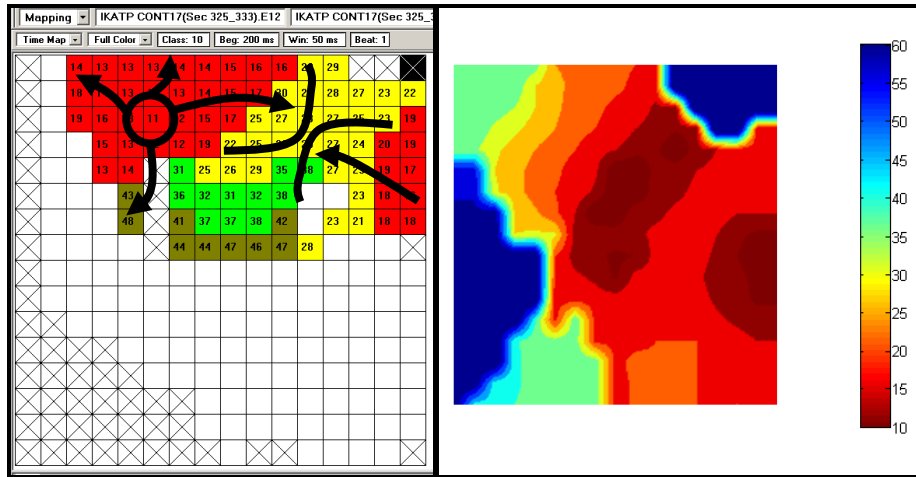


Figura 2.26. Parte izquierda: Matriz de electrodos de PaceMap[®] con tiempos de activación (en ms) detectados por cada electrodo, codificados en color, que permite identificar un afloramiento que colisiona con un frente individual. **Parte derecha:** Imagen suavizada de un mapa correspondiente a un afloramiento que colisiona con un frente individual, con su escala de tiempo (en ms) codificada en color (tomado de Díaz, 2012).

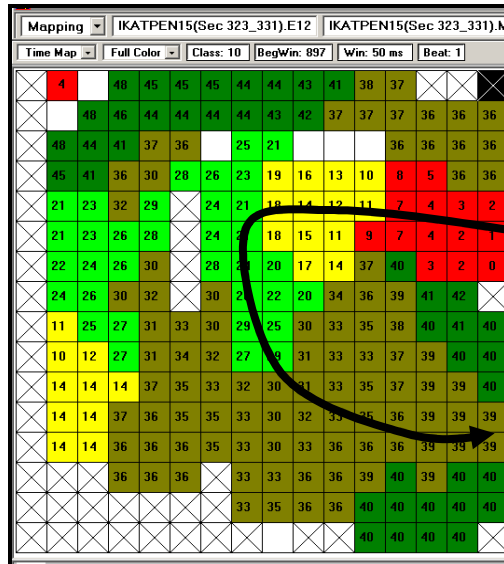


Figura 2.27. Matriz de electrodos de PaceMap[®] con tiempos de activación (en ms) detectados por cada electrodo, codificados en color, que permite identificar una torsión.

En el presente estudio se ha determinado la complejidad total de cada experimento. Para ello se calculó el sumatorio de los números de complejidad (o número de activaciones) que se detectaron en cada una de las once ventanas de 50 ms que se analizaron para cada experimento. A continuación, para establecer la complejidad total de cada grupo, se determinó el valor medio de las diferentes complejidades que aparecieron en cada experimento del propio grupo. Estos parámetros se determinaron previamente a la oclusión de la ACC y tras la oclusión de la misma.

Por ejemplo, para el grupo control se procedió de la siguiente manera:

Experimento	PRE	POST
Control 1	Complejidad _{Cont1}	Complejidad _{Cont1}
Control 2	Complejidad _{Cont2}	Complejidad _{Cont2}
Control 3	Complejidad _{Cont3}	Complejidad _{Cont3}
...
Control n	Complejidad _{Contn}	Complejidad _{Contn}
MEDIA GRUPO	Complejidad_{CONT PRE}	Complejidad_{CONT POST}

Donde el valor medio de la complejidad total para el grupo control (**Complejidad_{CONT}**) fue la media de las complejidades totales de cada experimento de dicho grupo (Complejidad_{Contn}) (Ecuación 2.11.), obtenido previamente a la oclusión de la ACC y tras la oclusión de la misma.

$$\text{Complejidad}_{\text{CONT}} = \frac{\text{Complejidad}_{\text{Cont1}} + \text{Complejidad}_{\text{Cont2}} + \dots + \text{Complejidad}_{\text{Contn}}}{N_{\text{CONT}}}$$

Ecuación 2.11. Complejidad total para el grupo control. Se obtiene del cociente entre el sumatorio de los valores de complejidad de cada experimento del grupo control y el número de experimentos válidos de dicho grupo (N_{CONT}).

Los parámetros descritos anteriormente, y ejemplarizados en el grupo control, se calcularon para el grupo entrenado y para el grupo tratado con el bloqueante de los canales K_{ATP} , antes de la oclusión de la ACC y tras la oclusión de la misma.

Además del estudio de la complejidad total, se analizaron los grados o niveles específicos de complejidad. Se ha realizado una clasificación propia para establecer los grados de complejidad, similar a la descrita por Konings et al. (1994) en el análisis de los mapas de activación durante la fibrilación auricular. Cada uno de los 11 mapas correspondientes a cada ventana de tiempo analizada, ha sido clasificado en 7 categorías o niveles de complejidad (categorías 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7), acorde al número de activaciones que se han identificado. Cuando en la ventana de 50 ms analizada aparecía una única forma de activación (ya fuese un frente único, o una reentrada, o un afloramiento) se le clasificaba como nivel 1 de complejidad; si aparecían dos formas de activación, se le clasificaba como nivel 2 de complejidad; y así sucesivamente hasta la categoría 6 (incluida). En la categoría 7 se incluyeron aquellos mapas con siete u ocho formas de activación (independientemente del tipo que fuesen). Se determinó el valor medio del número de eventos de las diferentes categorías de complejidad que se obtuvieron para cada grupo, antes de la oclusión

de la ACC y tras la oclusión de la misma. También se realizó para cada grupo, antes y después de ocluir la ACC, una descripción del porcentaje de los niveles o grados de complejidad obtenidos.

2.3. Grupos de estudio.

Se clasificó a los animales en tres grupos. Un grupo control, compuesto por un total de 20 conejos; un grupo sometido a un protocolo de entrenamiento físico, compuesto por un total de 16 conejos; y un grupo compuesto por un total de 17 conejos y sometido al bloqueo de los canales que vehiculan la corriente $I_{K_{ATP}}$ mediante la administración de glibenclamida durante el protocolo experimental.

2.4. Análisis estadístico.

Para la comparación de los parámetros del estudio, descritos anteriormente, del grupo entrenado y del grupo sometido al bloqueo del canal K_{ATP} respecto al grupo control, previamente a la oclusión coronaria, se utilizó el test “t” de Student para muestras no apareadas. Para esta misma comparación, pero tras la oclusión arterial coronaria, se usó un test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en el factor “oclusión”. Cuando se comparó el grupo entrenado con el tratado con glibenclamida, antes y después de la oclusión de la ACC, se usó un test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en el factor “oclusión”. Para la comparación, dentro de cada grupo, entre el valor previo a la oclusión y el valor después de la oclusión de la ACC de todos los parámetros anteriores, se ha usado un test “t” de Student para muestras apareadas.

Las diferencias observadas se han considerado significativas cuando $p \leq 0,05$.

2.5. Legislación.

Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales usados en la presente tesis doctoral se realizaron de acuerdo con lo establecido en la Unión Europea en materia de uso de animales con finalidad investigadora (2003/65/CE), promulgado en el Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre sobre protección de animales de experimentación y otros fines investigadores (B.O.E. número 252 del 21 de octubre de 2005). El comité ético del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universitat de València aprobó todos los procedimientos para la realización de esta tesis doctoral.

2.6. Financiación.

El estudio ha sido financiado con la ayuda del antiguo Ministerio de Ciencia e Innovación al proyecto titulado “*Efectos del entrenamiento sobre las modificaciones que la isquemia miocárdica produce en parámetros electrofisiológicos arritmogénicos. Implicación de la corriente $I_{K_{ATP}}$* ”, con referencia DEP2010-22318-C02-01, vigente hasta el 2013, y cuyo investigador principal es el doctor Luis Such Belenguer.

CAPÍTULO 3

Resultados

3.1. Longitud del ciclo durante la fibrilación ventricular.

En la tabla 3.1. y en la figura 3.1., mostramos los resultados relacionamos con la media de la longitud del ciclo fibrilatorio. Como podemos ver, la longitud del ciclo tendió a ser mayor en el grupo entrenado al compararlo con el grupo control, previamente a la oclusión coronaria.

MEDIA DE LOS INTERVALOS VV DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR			
GRUPO	PRE- OCCLUSIÓN	POST- OCCLUSIÓN (A)	POST- OCCLUSIÓN (B)
CONTROL	75 ± 8 (18)	84 ± 7* (15)	100 ± 8* (15)
ENTRENADO	79 ± 5# (12)	82 ± 9 (11)	90 ± 11*† (11)
GLIBENCLAMIDA	77 ± 8 (16)	95 ± 12*†‡ (11)	115 ± 8*†‡ (10)

Tabla 3.1. Media y desviación estándar de los intervalos VV, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). Los valores están expresados en milisegundos. Entre paréntesis el número de experimentos. †p≤0.05 respecto a control. #p=0.07 respecto a control. ‡p≤0.05 respecto a entrenado. *p≤0.05 respecto al valor previo a la oclusión.

La longitud del ciclo aumentó, tanto en el grupo control, como en el tratado con glibenclamida, tras 5 minutos de la oclusión coronaria, tanto cuando consideramos todo el territorio abarcado por el multielectrodo, que incluye al irrigado por la coronaria ligada (A), como al territorio que exhibió mayor daño, manifestado por la señal electrofisiológica (B). En ambas zonas, la longitud del ciclo del grupo tratado con glibenclamida fue mayor al compararlo con el grupo control y al compararlo con el grupo entrenado.

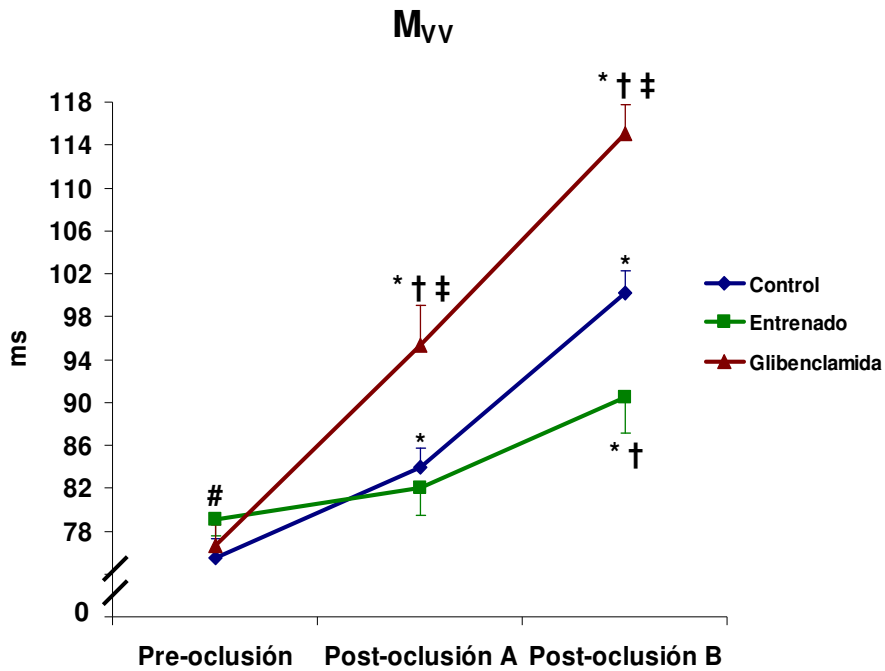


Figura 3.1. Media de los intervalos VV, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). Los valores están expresados en milisegundos. † $p \leq 0.05$ respecto a control. # $p = 0.07$ respecto a control. ‡ $p \leq 0.05$ respecto a entrenado. * $p \leq 0.05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras verticales corresponden al error típico.

En el grupo entrenado, el incremento de la longitud del ciclo tras la oclusión coronaria solamente se manifestó en el territorio que exhibió mayor daño, siendo, en esta zona, menor la longitud del ciclo del grupo entrenado que del grupo control.

La mediana de la distribución de los intervalos VV en cada grupo (M_{VV}), ha tenido un patrón similar a lo descrito anteriormente para la media (tabla 3.2. y figura 3.2.). Previamente a la oclusión coronaria, la

mediana de los intervalos VV fue mayor en el grupo entrenado al compararlo con el grupo control.

MEDIANA DE LOS INTERVALOS VV DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR

GRUPO	PRE- OCLUSIÓN	POST- OCLUSIÓN (A)	POST- OCLUSIÓN (B)
CONTROL	73 ± 8 (18)	77 ± 7# (15)	94 ± 9* (15)
ENTRENADO	78 ± 6† (12)	76 ± 8 (11)	84 ± 13† (11)
GLIBENCLAMIDA	75 ± 7 (16)	88 ± 15*†‡ (11)	118 ± 9*†‡ (10)

Tabla 3.2. Valor medio de la mediana de los intervalos VV y su desviación estándar, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). Los valores están expresados en milisegundos. Entre paréntesis el número de experimentos. †p≤0.05 respecto a control. ‡p≤0.05 respecto a entrenado. *p≤0.05 respecto al valor previo a la oclusión. #p=0.09 respecto al valor previo a la oclusión.

Tras 5 minutos de la oclusión coronaria, la mediana de los intervalos VV aumentó en el grupo control y en el tratado con glibenclamida, manteniéndose mejor este parámetro tras la agresión isquémica aguda en el grupo entrenado, tanto cuando se analizó en toda la zona cubierta por el multielectrodo como en la zona más deteriorada por la isquemia. En ambas zonas, la Mn_{VV} en el grupo tratado con glibenclamida fue mayor al compararlo con el grupo control y al compararlo con el grupo entrenado. El valor de la Mn_{VV} en el grupo entrenado se ha mantenido por debajo del valor de la Mn_{VV} del grupo control, alcanzando diferencias significativas en el territorio que exhibió mayor daño.

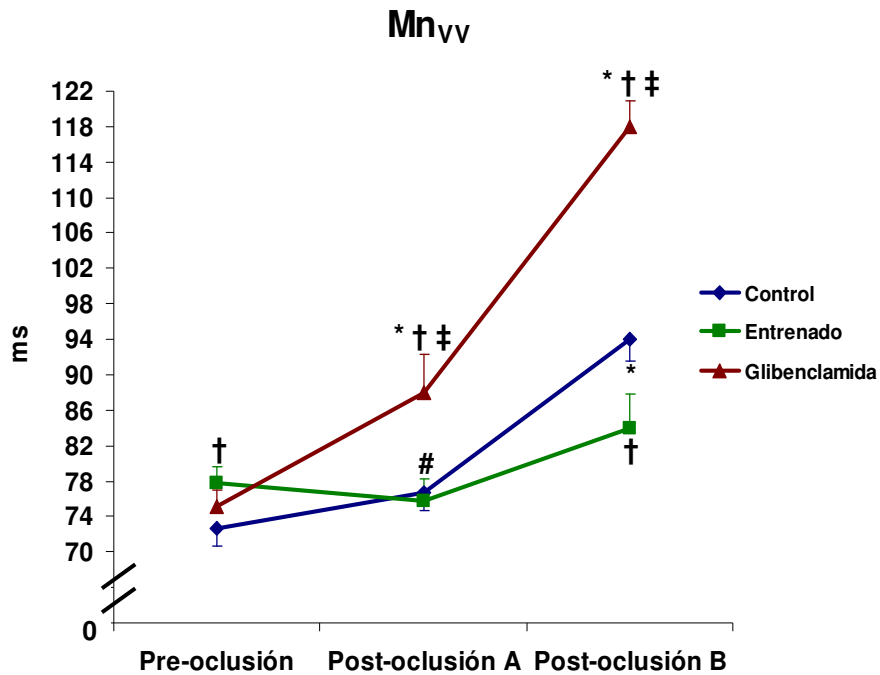


Figura 3.2. Mediana de los intervalos VV, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). Los valores están expresados en milisegundos. † $p \leq 0.05$ respecto a control. ‡ $p \leq 0.05$ respecto a entrenado. * $p \leq 0.05$ respecto al valor previo a la oclusión. # $p = 0.09$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras verticales corresponden al error típico.

3.2. Dispersión del ciclo durante la fibrilación ventricular.

En la tabla 3.3. y en la figura 3.3., mostramos el resultado correspondiente al coeficiente de variación de los intervalos VV (CV_{VV}) determinados en cada uno de los más de 200 puntos en los que se registró la FV, como medida de heterogeneidad miocárdica. Previamente a la oclusión arterial coronaria, el valor del CV_{VV} en los grupos entrenado y tratado con glibenclamida fue menor al compararlo con el grupo control.

COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS INTERVALOS VV DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR

GRUPO	PRE- OCCLUSIÓN	POST- OCCLUSIÓN (A)	POST- OCCLUSIÓN (B)
CONTROL	32 ± 5 (18)	38 ± 4* (15)	38 ± 11* (15)
ENTRENADO	27 ± 4† (12)	38 ± 6* (11)	36 ± 6* (11)
GLIBENCLAMIDA	28 ± 6† (16)	35 ± 3* (11)	30 ± 3# (10)

Tabla 3.3. Valor medio del CV de los intervalos VV y su desviación estándar, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). Entre paréntesis el número de experimentos. †p≤0.05 respecto a control. #p=0.08 respecto a control. *p≤0.05 respecto al valor previo a la oclusión.

Al comparar este parámetro, tras 5 minutos de la oclusión arterial coronaria, frente al valor previo a la oclusión, podemos observar como se produjo un incremento del CV_{VV} en todos los grupos cuando consideramos todo el territorio abarcado por el multielectrodo, y sólo en el control y en el entrenado cuando consideramos la zona más deteriorada por la isquemia. Al comparar el valor del CV_{VV} entre el grupo control y el entrenado, no hubo diferencias, tanto cuando se analizó en toda la zona como en la zona más deteriorada. Cuando la comparación la hicimos entre el grupo tratado con glibenclamida frente al control, encontramos que el CV_{VV} tendió a ser menor en el tratado en el territorio que exhibió mayor daño.

No hubo ninguna diferencia, en lo que respecta al CV_{VV} , entre el grupo entrenado y el tratado con glibenclamida, ni previamente a la oclusión arterial coronaria ni tras la misma.

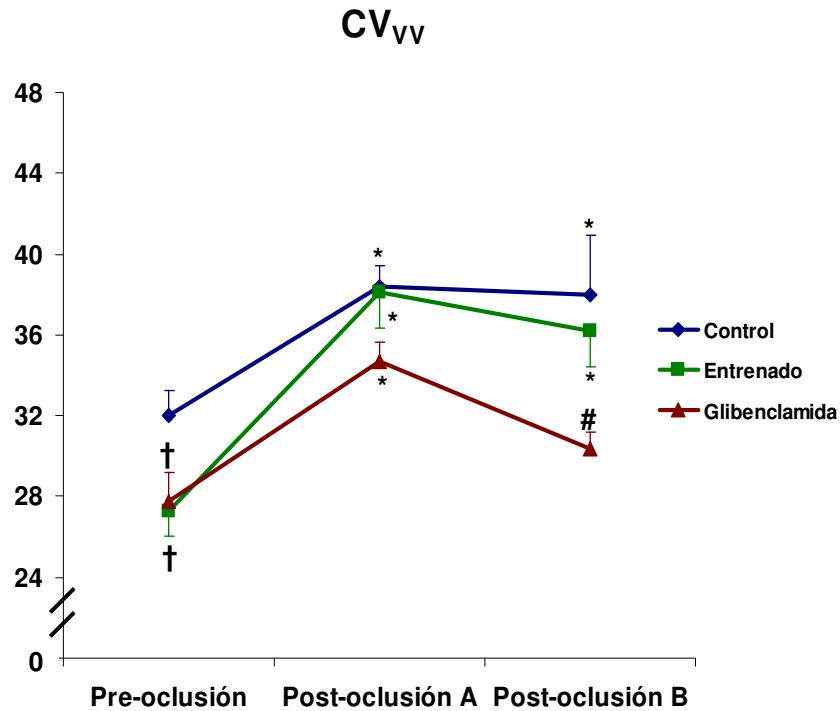


Figura 3.3. Coeficiente de variación de los intervalos VV, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). † $p \leq 0.05$ respecto a control. # $p = 0.08$ respecto a control. * $p \leq 0.05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras verticales corresponden al error típico.

3.3. Periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.

En la tabla 3.4. y en la figura 3.4., observamos el resultado correspondiente a la media de los periodos refractarios funcionales determinados en cada uno de los más de 200 puntos en los que se registró la FV. Al comparar el valor del periodo refractario del grupo entrenado frente a control, previamente a la oclusión arterial coronaria, encontramos que este parámetro fue mayor en el grupo entrenado

que en el control. No hallamos diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó este parámetro entre el grupo tratado con glibenclamida y el grupo control, antes de ocluir la ACC.

PERIODO REFRACTARIO FUNCIONAL DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR

GRUPO	PRE- OCCLUSIÓN	POST- OCCLUSIÓN (A)	POST- OCCLUSIÓN (B)
CONTROL	48 ± 6 (18)	52 ± 5* (15)	58 ± 4* (15)
ENTRENADO	53 ± 5† (12)	52 ± 7 (11)	53 ± 8† (11)
GLIBENCLAMIDA	51 ± 6 (16)	58 ± 5*†‡ (11)	59 ± 4*‡ (10)

Tabla 3.4. Media y desviación estándar del PRFFV, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). Los valores están expresados en milisegundos. Entre paréntesis el número de experimentos. †p≤0.05 respecto a control. ‡p≤0.05 respecto a entrenado. *p≤0.05 respecto al valor previo a la oclusión.

Tras 5 minutos de la oclusión coronaria, el PRFFV aumentó en el grupo control y en el tratado con glibenclamida tanto cuando consideramos todo el territorio abarcado por el multielectrodo como al territorio que exhibió mayor daño. Sin embargo, la oclusión coronaria no afectó significativamente a la refractariedad tras cinco minutos de la mencionada oclusión, en el grupo entrenado, manteniéndose mejor este parámetro tras la agresión isquémica aguda tanto en todo el territorio abarcado por el multielectrodo como en la zona más deteriorada. En el territorio que exhibió mayor daño por la isquemia, el PRFFV del grupo entrenado fue menor al compararlo con el grupo control. Al comparar el grupo tratado con glibenclamida respecto al entrenado, el PRFFV del tratado fue mayor en ambas zonas.

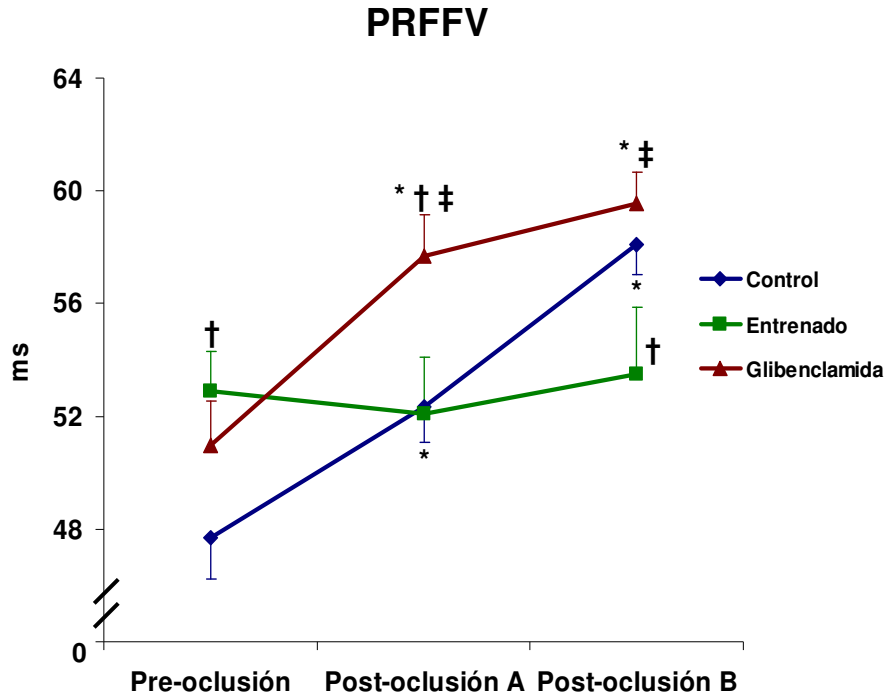


Figura 3.4. PRFFV, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). Los valores están expresados en milisegundos. † $p \leq 0.05$ respecto a control. ‡ $p \leq 0.05$ respecto a entrenado. * $p \leq 0.05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras verticales corresponden al error típico.

3.4. Dispersión del periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.

Analizados los periodos refractarios funcionales en cada uno de los puntos sobre los que se ubica el correspondiente electrodo de la placa multielectrodo se obtuvo la correspondiente media y desviación estándar que permitió el cálculo del coeficiente de variación del PRFFV, como medida de heterogeneidad miocárdica (tabla 3.5. y figura 3.5.).

Previamente a la oclusión arterial coronaria, el coeficiente de variación del PRFFV del grupo tratado con glibenclamida fue menor al compararlo con el grupo control. No hallamos diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó este parámetro entre el grupo entrenado y el grupo control, ni cuando se comparó el coeficiente de variación del PRFFV entre el grupo entrenado y tratado con glibenclamida.

COEFICIENTE DE VARIACIÓN DEL PERIODO REFRACTARIO FUNCIONAL DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR			
GRUPO	PRE- OCCLUSIÓN	POST- OCCLUSIÓN (A)	POST- OCCLUSIÓN (B)
CONTROL	19 ± 2 (18)	18 ± 3 (15)	20 ± 5 (15)
ENTRENADO	18 ± 3 (12)	19 ± 4 (11)	14 ± 5*# (11)
GLIBENCLAMIDA	16 ± 3† (16)	17 ± 6 (11)	19 ± 8 (10)

Tabla 3.5. Valor medio del CV del PRFFV y su desviación estándar, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). Entre paréntesis el número de experimentos. †p≤0.05 respecto a control. #p=0.06 respecto a control. *p≤0.05 respecto al valor previo a la oclusión.

La oclusión coronaria no modificó el CV del PRFFV ni en el grupo control ni en el grupo tratado con glibenclamida, ni cuando fue considerado todo el territorio abarcado por el multielectrodo ni en el territorio que exhibió mayor daño. En el grupo entrenado, el valor del CV del PRFFV obtenido en la zona más deteriorada (post-oclusión B) fue menor al obtenido previamente a la oclusión de la ACC. Asimismo, no hubo diferencias entre grupos cuando el análisis se realizó con el dato de dispersión correspondiente a toda la zona miocárdica

abarcada por la placa multielectrodo. En la zona que exhibió mayor daño por la isquemia, sí hubo una clara tendencia ($p=0,06$) hacia una menor heterogeneidad del PRFFV en el grupo entrenado cuando fue comparado respecto al grupo control. No hubo ninguna diferencia en lo que respecta al CV del PRFFV entre el grupo entrenado y el tratado con glibenclamida, tras la oclusión arterial coronaria, en ninguna de las dos zonas analizadas.

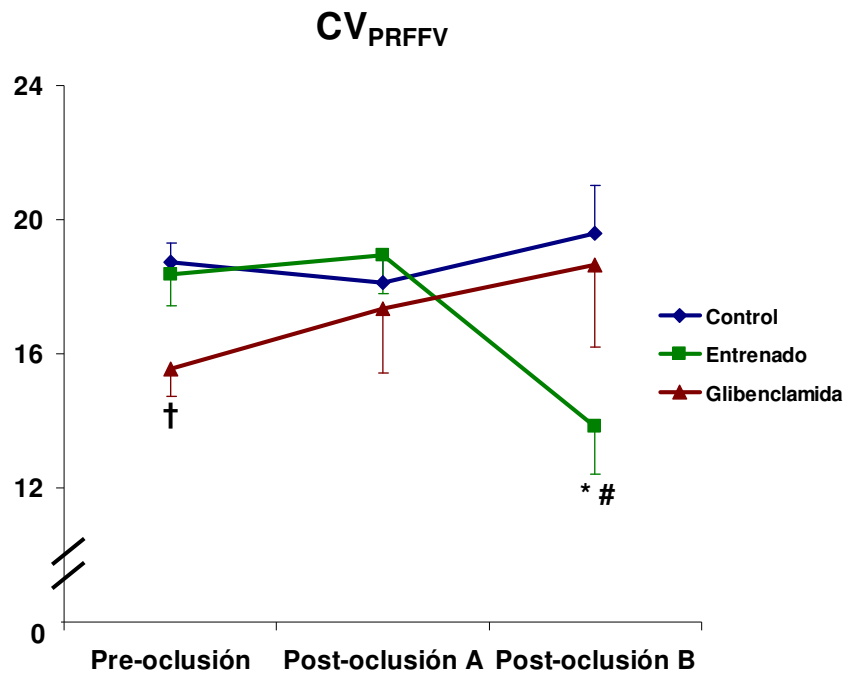


Figura 3.5. Coeficiente de variación del periodo refractario funcional durante la FV, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). † $p \leq 0.05$ respecto a control. # $p = 0.06$ respecto a control. * $p \leq 0.05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras verticales corresponden al error típico.

3.5. Dispersión de la frecuencia dominante durante la fibrilación ventricular.

En la tabla 3.6. y en la figura 3.6., mostramos los resultados relacionamos con el coeficiente de variación de la frecuencia dominante durante la FV, como medida de heterogeneidad miocárdica. Previamente a la oclusión arterial coronaria, el CV de la FD durante la FV fue menor en el grupo tratado con glibenclamida que en el grupo control. No hallamos diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó este parámetro entre el grupo entrenado y el grupo control, ni cuando se comparó este parámetro entre el grupo entrenado y el tratado.

COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LA FRECUENCIA DOMINANTE DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR

GRUPO	PRE- OCCLUSIÓN	POST- OCCLUSIÓN (A)	POST- OCCLUSIÓN (B)
CONTROL	17 ± 8 (18)	23 ± 6* (14)	24 ± 7* (13)
ENTRENADO	15 ± 7 (12)	20 ± 5* (11)	18 ± 7 (10)
GLIBENCLAMIDA	12 ± 4† (16)	21 ± 6* (12)	12 ± 9† (10)

Tabla 3.6. Valor medio del CV de la FD durante la FV y su desviación estándar, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 3 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). Entre paréntesis el número de experimentos. †p≤0.05 respecto a control. *p≤0.05 respecto al valor previo a la oclusión.

Tras 3 minutos de la oclusión coronaria, el CV de la frecuencia dominante durante la FV, aumentó en todos los grupos cuando ha sido considerado todo el territorio abarcado por el multielectrodo, no

habiendo diferencias entre los grupos. Cuando se consideró el territorio que exhibió mayor deterioro por la isquemia, el coeficiente de variación de la frecuencia dominante durante la FV aumentó en el grupo control, tras 3 minutos de la oclusión coronaria. No difirió respecto al valor de pre-oclusión ni en el grupo entrenado ni en el grupo tratado con glibenclamida. En esta zona analizada, el CV durante la FD del grupo tratado con glibenclamida fue menor al compararlo con el grupo control. No hubo diferencias ni entre el grupo entrenado y el control, ni entre el grupo entrenado y el tratado.

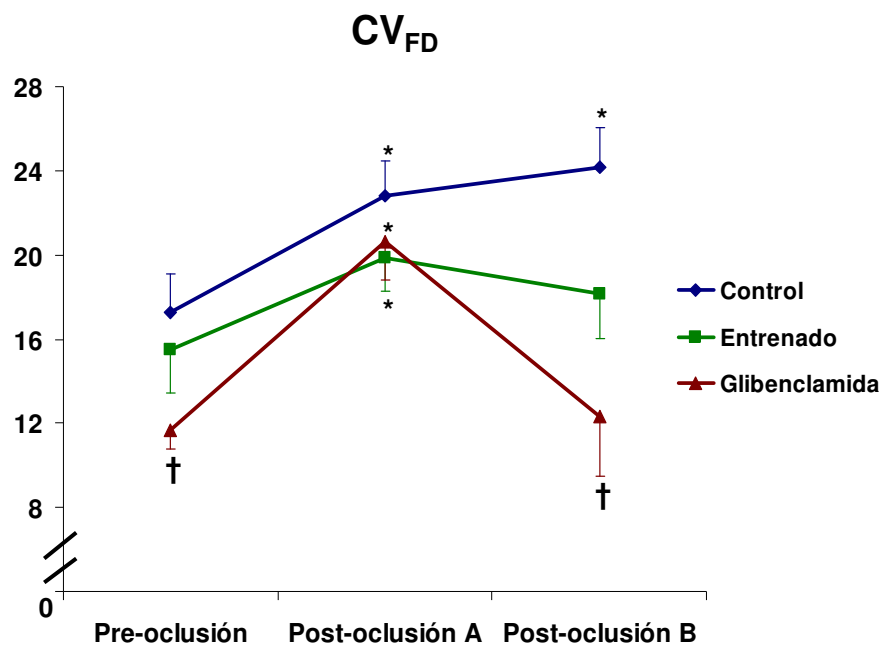


Figura 3.6. Coeficiente de variación de la frecuencia dominante durante la FV, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 3 minutos de la oclusión coronaria (post). Considerando después de la oclusión de la ACC el total de la zona registrada (post-oclusión A) y la zona más deteriorada (post-oclusión B). † $p \leq 0.05$ respecto a control. * $p \leq 0.05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras verticales corresponden al error típico.

3.6. Complejidad total de la activación miocárdica durante la fibrilación ventricular.

En la tabla 3.7. y en la figura 3.7. observamos los resultados correspondientes a la complejidad total de la activación miocárdica ventricular.

COMPLEJIDAD TOTAL DE LA ACTIVACIÓN MIOCÁRDICA DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR		
GRUPO	PRE-OCCLUSIÓN	POST-OCCLUSIÓN
CONTROL	47 ± 9 (18)	45 ± 9 (15)
ENTRENADO	42 ± 6† (12)	43 ± 10 (11)
GLIBENCLAMIDA	41 ± 7† (16)	33 ± 6*†‡ (11)

Tabla 3.7. Media y desviación estándar de la complejidad total de la activación miocárdica durante la FV, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Los valores están expresados en número de activaciones. Entre paréntesis el número de experimentos. †p≤0.05 respecto a control. ‡p≤0.05 respecto a entrenado. *p≤0.05 respecto al valor previo a la oclusión.

Previamente a la oclusión coronaria, se evidenció que los corazones de los animales entrenados exhibieron un nivel de complejidad menor en todo el miocardio ventricular cuando comparamos al grupo entrenado con el grupo control. Asimismo, en lo que respecta a los corazones sometidos a bloqueo del canal K_{ATP} , estos exhibieron un nivel de complejidad menor en todo el miocardio ventricular cuando comparamos al grupo tratado con el grupo control, no habiendo diferencias respecto al grupo entrenado.

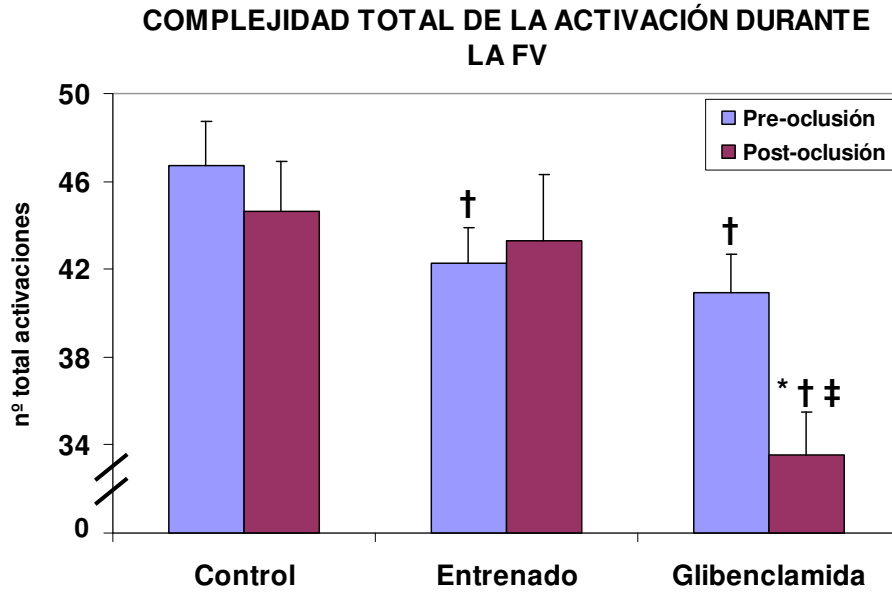


Figura 3.7. Complejidad total de la activación miocárdica durante la FV, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). Los valores están expresados en número de activaciones. † $p \leq 0.05$ respecto a control. ‡ $p \leq 0.05$ respecto a entrenado. * $p \leq 0.05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras verticales corresponden al error típico.

Al comparar los valores de complejidad total, tras 5 minutos de la oclusión arterial coronaria, frente al valor previo a la oclusión, tanto en el grupo control como en el entrenado no encontramos diferencias estadísticamente significativas. El valor de la complejidad total de la activación miocárdica ventricular disminuyó en el grupo tratado con glibenclamida tras la oclusión arterial coronaria. Cuando la comparación se hizo entre los grupos, el grupo tratado con glibenclamida exhibió una menor complejidad que el grupo control y que el grupo entrenado. No hubo diferencias cuando se comparó la complejidad total, tras 5 minutos oclusión, entre el grupo entrenado y el grupo control.

3.7. Grados específicos de complejidad de la activación miocárdica durante la fibrilación ventricular.

Previamente a la oclusión coronaria, al comparar entre los grupos control y tratado con glibenclamida (figura 3.8.), observamos que el valor medio en el tratado tendió a ser mayor para el **nivel 1** de complejidad ($0,06 \pm 0,24$, $n=18$ vs $0,38 \pm 0,62$, $n=16$), fue menor para el **nivel 6** ($1,50 \pm 1,47$, $n=18$ vs $0,56 \pm 0,89$, $n=16$) y menor para el **nivel 7** ($0,61 \pm 0,92$, $n=18$ vs $0,13 \pm 0,34$, $n=16$).

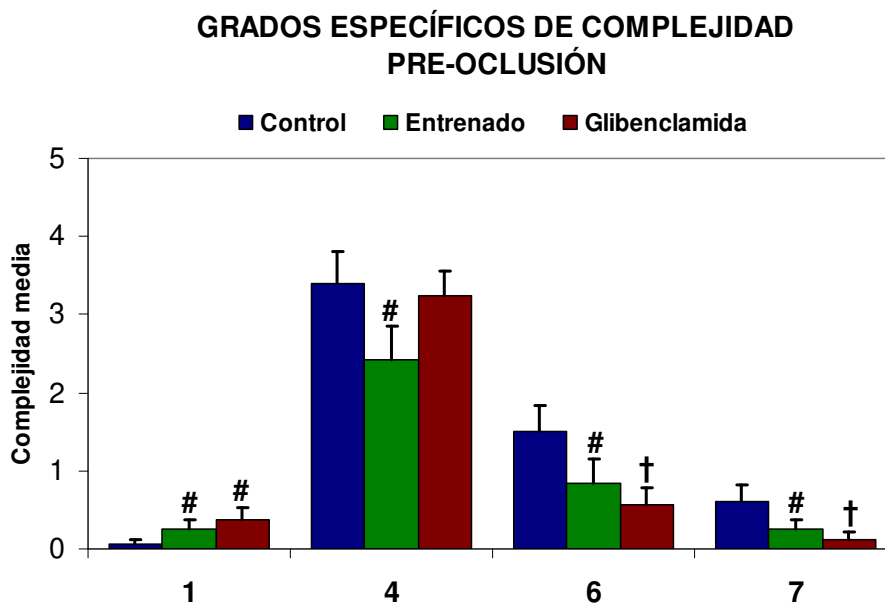


Figura 3.8. Complejidad media de la activación miocárdica durante la FV de los niveles 1, 4, 6 y 7, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, previamente a la oclusión coronaria. † $p \leq 0.05$ respecto a control. # $p \leq 0.09$ respecto a control. Las barras verticales corresponden al error típico.

Al comparar entre los grupos control y entrenado (figura 3.8.), observamos que el valor medio en el entrenado tendió a ser mayor

para el **nivel 1** de complejidad ($0,06 \pm 0,24$, $n=18$ vs $0,25 \pm 0,45$, $n=12$). El valor medio en el entrenamiento tendió a ser menor para el **nivel 4** ($3,39 \pm 1,82$, $n=18$ vs $2,42 \pm 1,51$, $n=12$), para el **nivel 6** ($1,50 \pm 1,47$, $n=18$ vs $0,83 \pm 1,11$, $n=12$) y para el **nivel 7** ($0,61 \pm 0,92$, $n=18$ vs $0,25 \pm 0,45$, $n=12$). Previamente a la oclusión arterial coronaria, no hay diferencia alguna en ningún nivel concreto de complejidad al comparar entre en grupo entrenado y tratado con glibenclamida.

Tras 5 minutos de la oclusión coronaria, no hubo modificación en el valor medio de ningún nivel de complejidad en el grupo control. En el grupo entrenado (figura 3.9.), sólo disminuyó el valor medio del **nivel 3** de complejidad ($3,33 \pm 1,78$, $n=12$ vs $2,00 \pm 1,26$, $n=11$).

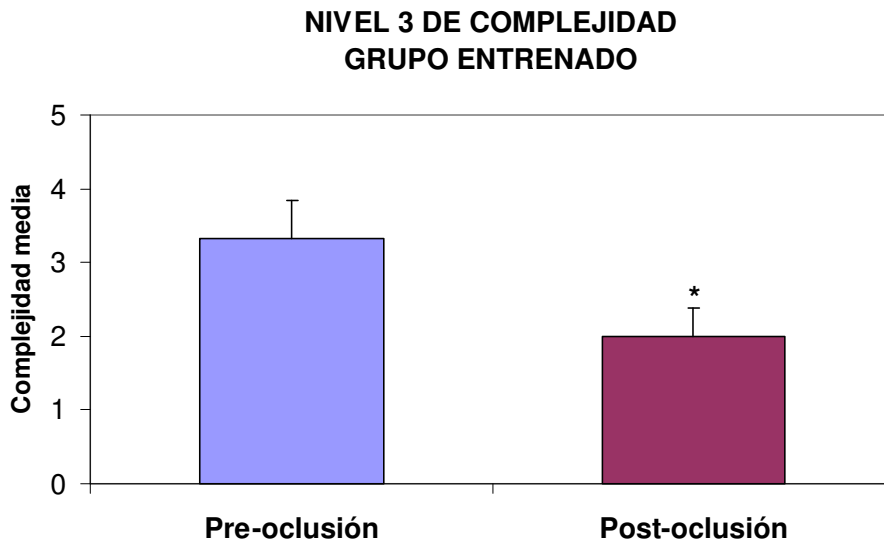


Figura 3.9. Complejidad media de la activación miocárdica durante la FV del nivel 3 en el grupo entrenado, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). * $p \leq 0,05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras verticales corresponden al error típico.

En el grupo tratado con glibenclamida (figura 3.10.), la oclusión coronaria produjo un aumento en los niveles de complejidad más bajos y una disminución en los niveles de complejidad más altos. Tras la oclusión aumentó el **nivel 1** de complejidad ($0,38 \pm 0,62$, $n=16$ vs $0,91 \pm 0,83$, $n=11$) y el **nivel 2** de complejidad ($1,38 \pm 1,41$, $n=16$ vs $2,55 \pm 1,63$, $n=11$). Por el contrario, se produjo una disminución en el **nivel 5** de complejidad ($2,31 \pm 1,40$, $n=16$ vs $1,09 \pm 1,30$, $n=11$) y hubo una tendencia a una menor complejidad del **nivel 4** ($3,25 \pm 1,18$, $n=16$ vs $2,45 \pm 0,93$, $n=11$) tras la oclusión coronaria.

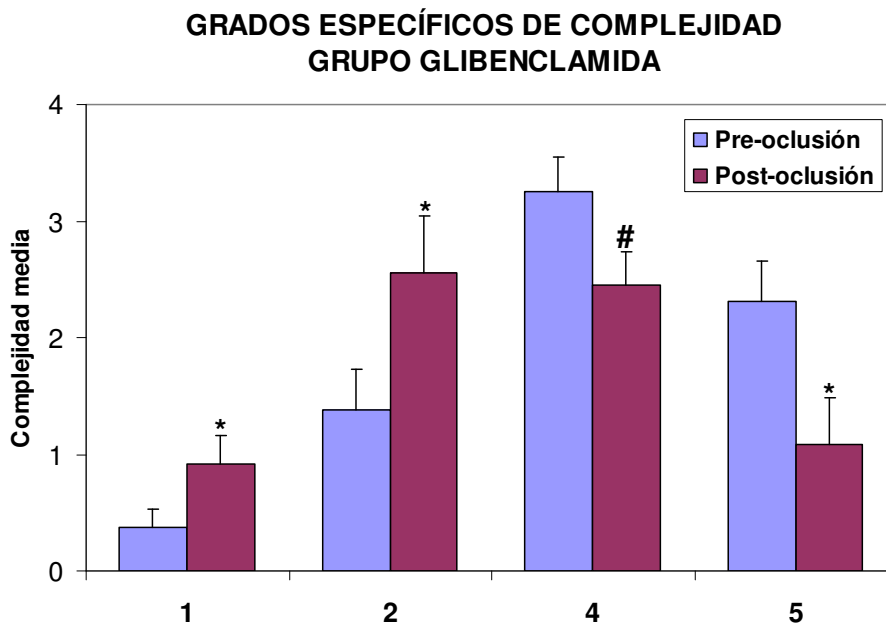


Figura 3.10. Complejidad media de la activación miocárdica durante la FV de los niveles 1, 2, 4 y 5 en el tratado con glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post). * $p \leq 0.05$ respecto al valor previo a la oclusión. # $p = 0.07$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras verticales corresponden al error típico.

En la figura 3.11. se pueden observar el valor medio de algunos de los niveles concretos de complejidad, tras 5 minutos de la oclusión arterial coronaria, en los grupos control, entrenado y tratado con glibenclamida. Al comparar entre los grupos control y entrenado, no hallamos diferencias en ningún nivel de complejidad tras 5 minutos de la oclusión arterial coronaria.

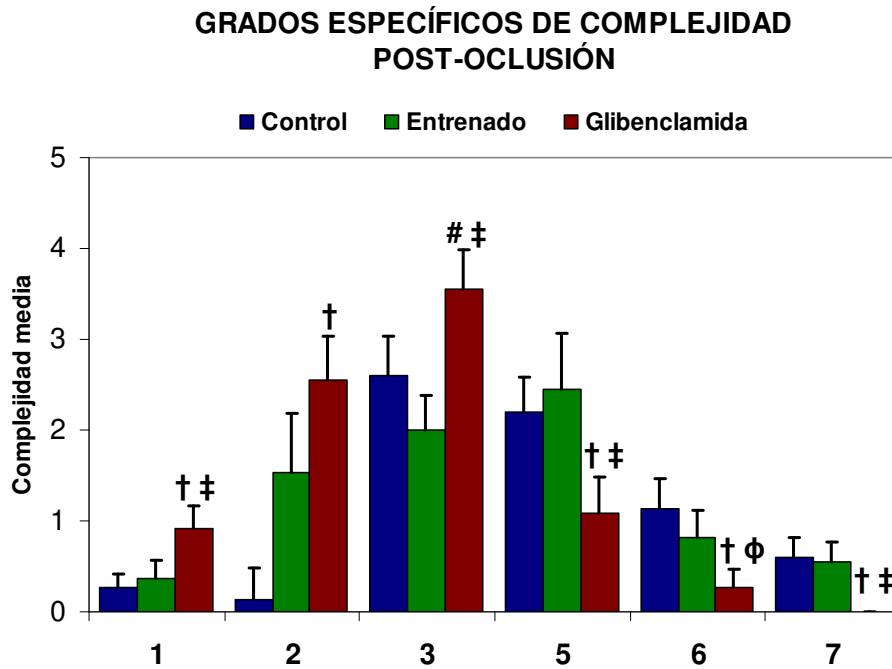


Figura 3.11. Complejidad media de la activación miocárdica durante la FV de los niveles 1, 2, 3, 5, 6 y 7, en los grupos control, entrenado y glibenclamida, después de 5 minutos la oclusión coronaria (post). † $p \leq 0.05$ respecto a control. # $p = 0.07$ respecto a control. ‡ $p \leq 0.05$ respecto a entrenado. φ $p = 0.07$ respecto a entrenado. Las barras verticales corresponden al error típico.

Al comparar los niveles concretos de complejidad entre el grupo control y el tratado con glibenclamida, tras la oclusión coronaria, encontramos que el valor medio en el tratado fue mayor en el **nivel 1**

($0,27 \pm 0,59$, $n=15$ vs $0,91 \pm 0,83$, $n=11$) y en el **nivel 2** ($1,13 \pm 1,36$, $n=15$ vs $2,55 \pm 1,63$, $n=11$) de complejidad; tendió a ser mayor en el **nivel 3** ($2,60 \pm 1,72$, $n=15$ vs $3,55 \pm 1,44$, $n=11$) de complejidad; y fue menor en el **nivel 5** ($2,20 \pm 1,52$, $n=15$ vs $1,09 \pm 1,30$, $n=11$), en el **nivel 6** ($1,13 \pm 1,30$, $n=15$ vs $0,27 \pm 0,65$, $n=11$) y en el **nivel 7** ($0,60 \pm 0,83$, $n=15$ vs 0 ± 0 , $n=11$) de complejidad.

Al comparar entre el grupo entrenado y el tratado con glibenclamida tras la oclusión coronaria, encontramos que el valor medio en el tratado fue mayor en el **nivel 1** ($0,36 \pm 0,67$, $n=11$ vs $0,91 \pm 0,83$, $n=11$) y en el **nivel 3** ($2,00 \pm 1,26$, $n=11$ vs $3,55 \pm 1,44$, $n=11$) de complejidad; fue menor en el **nivel 5** ($2,45 \pm 2,02$, $n=11$ vs $1,09 \pm 1,30$, $n=11$) de complejidad; tendió a ser menor en el **nivel 6** ($0,82 \pm 0,98$, $n=11$ vs $0,27 \pm 0,65$, $n=11$) de complejidad; y fue menor en el **nivel 7** ($0,55 \pm 0,69$, $n=11$ vs 0 ± 0 , $n=11$) de complejidad.

En la figura 3.12., se halla representada la incidencia relativa de los diferentes grados de complejidad del proceso de activación miocárdica durante la fibrilación ventricular correspondientes a los grupos control, entrenado y tratado con glibenclamida, previamente y tras la oclusión arterial coronaria.

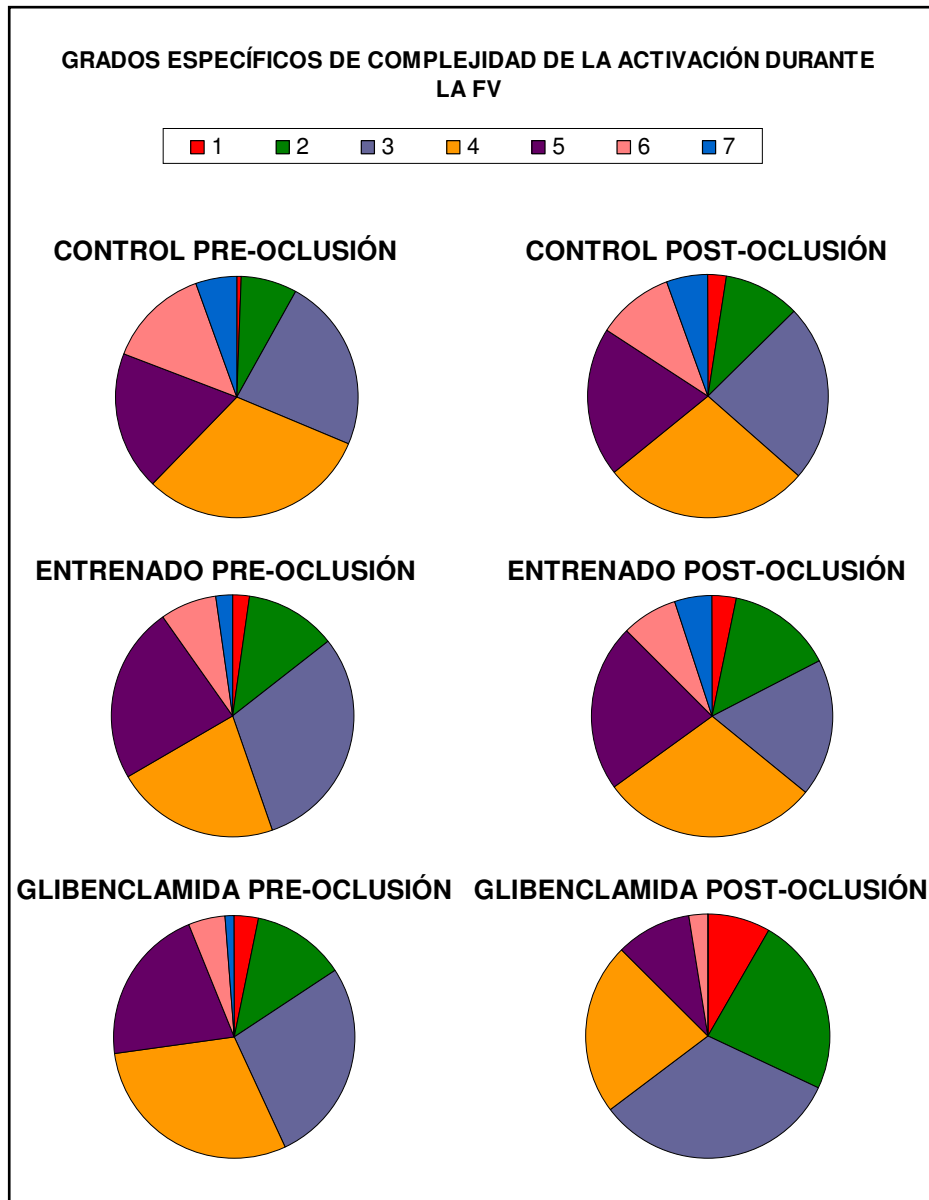


Figura 3.12. Incidencia relativa de los diferentes grados de complejidad (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) del proceso de activación miocárdica durante la FV correspondientes al grupo control, entrenado y glibenclamida, antes (pre) y después de 5 minutos de la oclusión coronaria (post).

CAPÍTULO 4

Discusión

4.1. Consideraciones generales.

En la presente tesis doctoral se ha investigado, en corazón normalmente oxigenado, y posteriormente sometido a isquemia regional aguda, el efecto de la realización de un protocolo de entrenamiento físico sobre una serie de parámetros relacionados con la refractariedad y heterogeneidad electrofisiológica del miocardio, así como sobre la complejidad de la activación eléctrica. Asimismo, se ha pretendido investigar la participación del canal K_{ATP} en las citadas modificaciones electrofisiológicas intrínsecas producidas por el ejercicio físico crónico.

Este trabajo de investigación tiene un interés doble. En primer lugar, desde un punto de vista fisiológico y fisiopatológico básico, ya que se han investigado varias modificaciones electrofisiológicas intrínsecas producidas por el ejercicio físico crónico, tanto en el corazón normalmente oxigenado como en el sometido a isquemia regional aguda. En segundo lugar, en tanto y cuanto se puede implicar al presente trabajo de investigación dentro de las investigaciones encaminadas a intentar dilucidar la participación del canal K_{ATP} en el efecto protector que ejerce la realización de ejercicio físico regular sobre alguno de los parámetros electrofisiológicos relacionados con la instauración, mantenimiento y cese de la fibrilación ventricular, que como ha sido publicado es la principal causa de muerte súbita de origen cardíaco (Billman, 2002).

Las propiedades y/o parámetros electrofisiológicos han sido investigados, en corazón aislado y normalmente perfundido, de los

animales control, de los animales sometidos a un protocolo de entrenamiento sobre cinta sin fin y del grupo sometido al bloqueo de los canales K_{ATP} durante el protocolo experimental, antes y después de producir isquemia regional aguda. Estas propiedades han sido: la dispersión de la longitud del ciclo durante la FV (longitud de los intervalos VV, su mediana y su coeficiente de variación), el periodo refractario funcional durante la FV y su dispersión en una amplia zona epicárdica del miocardio ventricular, la dispersión de la frecuencia dominante durante la FV, como estudio en el dominio de la frecuencia, y la complejidad de la activación miocárdica durante la FV.

Previamente a la discusión de los resultados obtenidos, se procederá a realizar unos comentarios de carácter general respecto a la metodología empleada en la presente tesis doctoral.

4.2. Consideraciones relativas a los métodos empleados.

4.2.1. Respecto a los animales de experimentación.

Desde el punto de vista de especies, uno de los motivos de escoger el conejo como animal para el modelo de corazón aislado, es porque es posible perfundir su corazón con líquidos de fácil disponibilidad y preparación, lo que representa una ventaja si lo comparamos con el corazón de animales como el perro, que requiere sangre completa para su perfusión. Además, el corazón de conejo es de fácil manipulación, lo que le da también ventajas respecto al corazón de animales más pequeños como el de la rata o el de la cobaya, y también más grandes como el de perro o el de cerdo.

Igualmente, el conejo representa una clara ventaja respecto a otros animales para los estudios de arritmias y fármacos antiarrítmicos. Así, por ejemplo, el ratón es un mal modelo, ya que tiene una masa ventricular pequeña y una frecuencia cardíaca muy rápida, con una duración corta del PA (ver revisión de Riascos et al., 2004). Además la inducción y el mantenimiento de la FV son muy difíciles ya que los circuitos reentrantes, que son necesarios para la propagación de la misma, difícilmente se forman en estos animales (Billman, 2002).

4.2.2. Respecto al sistema de perfusión tipo Langendorff.

En 1895, el médico y fisiólogo alemán Oscar Langendorff publicó un trabajo titulado "*Investigaciones sobre la supervivencia del corazón mamífero*", en el cual describía un método para mantener vivo un corazón aislado de oveja. Este trabajo abrió definitivamente las puertas para la investigación sobre la mecánica, el metabolismo y la farmacología cardíaca, así como, el estudio de la fisiología de la circulación coronaria (ver revisión de Riascos et al., 2004). Más de 100 años después, esta técnica experimental ha permitido realizar numerosos estudios con muy diversas finalidades. Concretamente, en nuestro grupo de trabajo esta técnica ha sido muy empleada, posibilitando la realización de diversas investigaciones sobre los diversos parámetros electrofisiológicos y su modificación por la acción de fármacos (Chorro et al., 2000a), de manipulaciones mecánicas locales (Chorro et al., 2005; Chorro et al., 2009), de lesiones por radiofrecuencia (Chorro et al., 2008; Chorro et al., 2011) y de otros tipos de intervenciones como las más recientes sobre cambios

térmicos (Tormos et al., 2008) y en especial el ejercicio físico (Such et al., 2008).

Entre las ventajas de este modelo experimental se pueden destacar su reproducibilidad, su bajo coste y la posibilidad de medir variables en ausencia de factores reguladores extrínsecos, como los factores neurohumorales circulantes y las influencias nerviosas centrales. Además, esta preparación permite continuar los experimentos a pesar de circunstancias (paro cardíaco o arritmias) que, para una preparación *in vivo* serían mortales (ver revisión de Riascos et al., 2004). Por otra parte, el desencadenamiento de la FV *in vivo* implica la abolición de la perfusión coronaria, la aparición de isquemia y el deterioro metabólico del miocardio, que por sí mismos modifican las características del proceso fibrilatorio (Chorro et al., 2002a). Por lo tanto, la utilización de modelos experimentales en los que se mantiene la perfusión coronaria durante la FV permite mantener un estado metabólico adecuado durante el proceso fibrilatorio, excluyendo esta variable a la hora de analizar sus características, además de obtener condiciones experimentales estables y reproducibles que permiten evaluar los efectos de distintas variables sobre el patrón fibrilatorio ventricular (Chorro et al., 2000b; Chorro et al., 2002a).

4.2.3. Respecto a la metodología para la determinación de los parámetros electrofisiológicos.

En el presente trabajo de investigación se provoca y mantiene la fibrilación ventricular sin interrumpir la perfusión. La fibrilación, en tal

caso, no daña al corazón, es un instrumento metodológico para estudiar una serie de propiedades electrofisiológicas en los múltiples puntos en los que se registra la arritmia, así como la dispersión de dichas propiedades por todo el miocardio ventricular que abarca el multielectrodo de registro. Así pues, se analiza la fibrilación en el dominio del tiempo (intervalos entre activaciones ventriculares, percentil 5 de los intervalos de los ventriculogramas, etc.) para determinar periodos refractarios, heterogeneidad electrofisiológica, complejidad de la activación, etc. pero en ningún caso tal fibrilación es similar a la real, en la que hay una isquemia global del miocardio. Se induce sin interrumpir la perfusión global, para usarla como instrumento metodológico, como se ha usado en múltiples trabajos publicados en revistas, con el fin de analizar diversas propiedades electrofisiológicas miocárdicas (Chorro en al., 2000a; Chorro et al., 2002b; Tormos et al., 2008).

Respecto a la determinación del periodo refractario durante la FV ha sido usado uno de los métodos descritos por Duytschaever et al. (2001), basándonos en la determinación del percentil 5 del histograma que representa entre 4000 y 7000 longitudes de ciclo durante la fibrilación ventricular. Este método se basa en el supuesto de que en el ciclo más corto de la fibrilación no existe prácticamente *gap excitable* (zona de tejido excitable entre el frente de la onda reentrante y la cola de refractariedad que genera). O expresado de otra forma, que el percentil 5 de los electrogramas unipolares se corresponde con el mínimo valor de longitud de ciclo que se podía producir, ya que por debajo de dicho valor nos encontraríamos en periodo refractario. Además, el empleo de este método para la determinación del periodo

refractario funcional, permite excluir una estimulación externa al propio corazón, como es el caso del método basado en el test del extraestímulo, que informa de la capacidad del tejido miocárdico ventricular para permitir el paso de frentes de activación sucesivos en tanto el tejido no se halle en periodo refractario.

4.3. Consideraciones relativas a los resultados obtenidos y su significado.

4.3.1. Respecto a la refractariedad miocárdica.

Como puede deducirse en lo expuesto en el apartado de resultados, la realización de ejercicio físico crónico apunta a un incremento de la refractariedad miocárdica ventricular previamente a la oclusión coronaria, ya que los parámetros analizados por nosotros relacionados con esta propiedad han sido modificados en el sentido que acabamos de indicar. El análisis de la FV en el dominio del tiempo evidenció que previamente a la oclusión coronaria, la media de los intervalos VV tendía a ser mayor ($p=0,07$) en los corazones de los animales entrenados que en los control. En el caso de la mediana de los mismos intervalos VV, esta fue significativamente mayor en los corazones de los animales entrenados que en los control previamente a la oclusión coronaria. Estos resultados se hallan en consonancia con resultados previos obtenidos por nuestro grupo, en los que la frecuencia durante la FV (valor inverso de la longitud del ciclo) fue menor (por tanto el ciclo mayor) en los animales entrenados que en los controles (Such et al., 2008; Zarzoso et al., 2012). Ha sido publicado que la inversa de los intervalos, es decir la frecuencia

durante la fibrilación, se corresponde y se modifica de modo paralelo a la refractariedad miocárdica (para revisión ver Chorro et al., 2000a).

El percentil 5 de los intervalos antes mencionados (medida aproximada de la refractariedad funcional), previamente a la oclusión coronaria, fue mayor en los corazones procedentes de los animales entrenados que en los controles. El mayor periodo refractario ventricular de los corazones procedentes de los animales entrenados que el de los controles, previamente a la oclusión coronaria, representa una protección antiarrítmica como es clásicamente conocido. Efectivamente, la disminución del periodo refractario se acompaña asimismo de una disminución en la longitud de onda del proceso de activación miocárdico, siendo éste parte del sustrato sobre el que se asientan los fenómenos reentrantes (Wijffels et al., 1995).

Otros autores ya obtuvieron resultados similares a los nuestros analizando la duración del potencial de acción global o parcial (Tibbits et al., 1981; Gwathmey et al., 1990; Jew et al., 2001; Natali et al., 2002), que como sabemos, la correspondencia o correlación entre el periodo refractario efectivo y el potencial de acción, estudiada por Sutton et al. (2000), es buena en condiciones de normoxia. Ha sido observado recientemente por nuestro grupo de trabajo, un aumento de la refractariedad ventricular, tanto efectiva como funcional, investigando dichos parámetros en los corazones de animales entrenados (Such et al., 2008).

La ausencia de diferencias en la refractariedad, previamente a la oclusión coronaria, al comparar los corazones tratados con glibenclamida con los control, nos parece un resultado que abala a la

glibenclamida como un instrumento metodológico adecuado, ya que, en principio, esperamos que sus efectos electrofisiológicos se evidencien solamente en corazón sometido a isquemia aguda; periodo en el que se manifiesta la apertura del canal K_{ATP} . Tal y conforme ha sido publicado, los canales K_{ATP} están activados por un descenso del cociente ATP/ADP en condiciones de hipoxia/isquemia, que vincula el metabolismo celular a la excitabilidad de los cardiomiocitos (para revisión ver Vajda et al., 2007).

Nosotros no hemos investigado los mecanismos básicos por los cuales los periodos refractarios fueron mayores en los animales entrenados. No obstante, sobre la base de experimentos realizados por otros investigadores, podemos implicar, a nivel electrofisiológico celular, a ciertas corrientes y/o transportes iónicos. Jew et al. (2001) encontraron, en cardiomiocitos aislados de ventrículo izquierdo de ratas sometidas a entrenamiento: a) una reducción en la densidad de corrientes repolarizantes de potasio de inactivación lenta o sostenida, a las que ellos y otros autores denominaron I_{sus} o I_{late} (Himmel et al., 1999), y b) al mismo tiempo que también encontraron un incremento en la rapidez a la cual se alcanza el pico de la corriente I_{to} que, como es sabido, es una corriente de salida de potasio transitoria y responsable del inicio de la repolarización rápida del cardiomiocito; y un tenue pero significativo incremento en la densidad de corrientes I_{to} en los cardiomiocitos aislados del ventrículo izquierdo de la rata. Para estos autores (Jew et al., 2001), el entrenamiento también pareció afectar a la amplitud del pico y a la forma de la fase de repolarización temprana del potencial de acción registrado en miocitos aislados de cultivos. No obstante, estos autores no determinaron cuál de los

componentes específicos de estas corrientes que contribuyen, I_{sus} o I_{late} e I_{to} , son afectados por el entrenamiento, ni determinaron si las adaptaciones de las corrientes repolarizantes de potasio, voltaje dependiente, son regionalmente variables en el miocardio ventricular.

La posibilidad de que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (que como es sabido, tiene propiedades electrogénicas y podría variar la duración del PA) pudiera estar implicado en las modificaciones de la duración del potencial de acción y/o refractariedad, fue investigada por Mace et al. (2003). No obstante, tal posibilidad fue descartada por los mismos autores. Collins et al. (2005), realizaron una investigación experimental sobre la cardioprotección inducida por el ejercicio físico diario en ratas normotensas, sedentarias hipertensas y entrenadas hipertensas, y encontraron que si bien las ratas hipertensas exhibieron una mayor expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, el ejercicio redujo dicha expresión. Esto complica la interpretación del efecto del ejercicio físico sobre la refractariedad desde el punto de vista de su acción sobre el sistema de transporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mencionado.

También se ha tratado de implicar a la corriente lenta de entrada de calcio (tipo L) en las modificaciones del potencial de acción producidas por el ejercicio físico crónico, pero al parecer el entrenamiento no afecta a estas corrientes, y puede suprimir la actividad del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en cardiomiocitos intactos (Mokelke et al., 1997; Palmer et al., 1999).

En cuanto al efecto de la oclusión coronaria, hemos podido observar cómo a consecuencia de esta manipulación se ha producido

en los grupos control y tratado con glibenclamida un aumento de la refractariedad manifestado en todos aquellos parámetros relacionados más o menos directamente con la misma, esto es, el percentil 5 de los intervalos VV (como expresión del periodo refractario funcional), y la media y mediana (en este último parámetro, en el grupo control y cuando se consideró toda la zona abarcada por el multielectrodo, se observó una tendencia con una $p=0,09$) de los intervalos VV. En los corazones de los animales entrenados se mantuvo la refractariedad en el miocardio sometido a isquemia regional. Los parámetros relacionados con la refractariedad miocárdica han sido determinados no solamente en toda la zona correspondiente a la coronaria ligada y sobre la que aplicamos el multielectrodo de registro, sino, que lo hemos determinado en la zona más dañada, desde el punto de vista electrofisiológico, por la oclusión coronaria aguda, apoyándonos en el análisis de la morfología del trazado fibrilatorio. Ello lo hemos hecho porque consideramos menos representativo un periodo refractario medio, en un territorio que posee zonas muy dañadas en la parte central, y el resto, en el que hay incluso una tenue “zona limítrofe”.

Si bien el incremento de la refractariedad es un factor antiarritmogénico considerado de modo aislado, el incremento de la misma tras la oclusión coronaria, deja de exhibir carácter beneficioso. Por ello, el mantenimiento de la refractariedad lo interpretamos como un efecto beneficioso del ejercicio físico crónico. Contrariamente, el incremento de la refractariedad que observamos en los grupos control y tratado con glibenclamida lo consideramos como un efecto derivado de la privación circulatoria. Efectivamente, analizando un parámetro muy directamente relacionado con la refractariedad miocárdica, como

es la frecuencia de la fibrilación, Strohmerger et al. (1997) relataron que además de que la isquemia progresiva debida a la fibrilación resultaba en un rápido agotamiento de los fosfatos de alta energía del miocardio, en un deterioro de los potenciales transmembrana, en la sobrecarga de calcio intracelular, en una disminución de frecuencia auricular y en un aumento de la probabilidad de disociación electromecánica tras choques eléctricos (Zipes, 1975; Clusin et al., 1984; Martin et al., 1986; Neumar et al., 1990; Hillsley et al., 1994; citados por Strohmerger et al., 1997), también se manifestaba por una caída de la frecuencia durante la fibrilación ventricular. Inversamente, otros autores hallaron en pacientes una gran probabilidad de evolución favorable después de la desfibrilación cuando los valores de la frecuencia dominante de la misma se mantenían tras isquemia global del miocardio (Stewart et al., 1992; Strohmerger et al., 1994; Brown & Dzwonczyk, 1996; citados por Strohmerger et al., 1997). Por tanto, podemos dar una consideración de efecto deletéreo al incremento de la refractariedad que, como acabamos de ver, alguno de los autores citados relata un deterioro metabólico coincidente con la caída de la frecuencia fibrilatoria (Neumar et al., 1990), o lo que es similar, el incremento de la refractariedad. De modo similar, estudios previos realizados por nosotros evidenciaron una caída de la frecuencia dominante durante la fibrilación tras la oclusión coronaria, que fue preservada por el entrenamiento (Such-Miquel et al., 2007).

Por otro lado, como ha sido comentado anteriormente, en el grupo tratado con el bloqueante del canal K_{ATP} , glibenclamida, el hecho de que la refractariedad aumentara tras la oclusión coronaria, indica que el bloqueo pareció operar poco favorablemente sobre los

cardiomiocitos, al menos en lo que al deterioro metabólico se refiere, y en consecuencia, al daño estructural. Como hemos descrito en el apartado de introducción, hay autores que han demostrado que la apertura del canal K_{ATP} , y no el bloqueo del mismo, ejerce un efecto protector sobre el miocardio isquémico. Los efectos beneficiosos de la apertura del canal se han manifestado, en los trabajos que defienden la bondad de la misma, en una reducción en el tamaño de la lesión miocárdica (Lederer et al. 1989; Gross & Auchampach, 1992; Gross & Peart, 2003; Powers et al., 2008; Li & Dong, 2010). En consecuencia y conectando con lo que acabamos de decir, en lo que respecta a los efectos del entrenamiento y del bloqueo del canal K_{ATP} con la refractariedad, parece darle mayor verosimilitud a los autores que defienden que la apertura del canal, siendo beneficiosa, es el mecanismo básico que exhiben los animales entrenados que sufren isquemia miocárdica aguda (Brown et al., 2005; Quindry et al., 2010; Zingman et al., 2011; Quindry et al., 2012).

Si como parece ser, a la vista de los resultados que estamos comentando, el bloqueo del canal K_{ATP} no parece estar implicado en lo que hemos comentado como un efecto beneficioso, otros mecanismos descritos por diversos autores podrían haber participado en el efecto protector del ejercicio físico crónico; desde las modificaciones metabólicas sobre el corazón que produce el entrenamiento (Scheuer & Tipton, 1977), hasta mecanismos ligados a las proteínas intracelulares implicadas en la homeostasis del calcio intracelular (Collins et al., 2005), a la mejora de la defensa antioxidante (niveles tisulares de glutatión, proteínas de choque térmico, encimas ligados a la protección frente al estrés oxidativo, etc.) (Demirel et al., 2001), a

los acontecimientos ligados a la apertura del megacanal o poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Marcil et al., 2006), a la producción de óxido nítrico (Hajnal et al., 2005; Such et al. 2008), a mecanismos mediados por la proteinquinasa C (Yamashita et al., 2001), a la mejora de la dinámica circulatoria coronaria (Brown et al., 2003), y/o a la atenuación de las respuestas cardíacas de los receptores β 2-adrenérgicos (Billman et al., 2006). Todos estos son mecanismos que de un modo u otro han podido ejercer un efecto que, preservando al miocardio de los animales entrenados, pueden subyacer a los resultados que acabamos de comentar. Del mismo modo, diversos autores han implicado, entre los mecanismos básicos, a la acción vagal debida al entrenamiento (Billman, 2002). Si bien, nuestro modelo se trata de corazón aislado, y por tanto desconectado de influencias nerviosas centrales, durante el periodo de entrenamiento se pudieron producir, como consecuencia de la acción vagal, modificaciones que “preparan” mejor al corazón frente a la agresión isquémica.

4.3.2. Respecto a la heterogeneidad electrofisiológica.

Como es clásicamente sabido y más adelante será comentado, esta propiedad ha sido investigada por su relación con los procesos reentrantes que amenazan la vida. Los parámetros investigados como índice de heterogeneidad han sido los coeficientes de variación de las longitudes de los ciclos fibrilatorios, de la frecuencia dominante durante la fibrilación ventricular y del percentil 5 de los intervalos VV, que como hemos ya señalado, estos últimos representan de modo bastante aproximado la dispersión del periodo refractario funcional del

miocardio ventricular durante la FV. Todo ello fue determinado con el fin de investigar el efecto del ejercicio físico crónico y del bloqueo del canal K_{ATP} sobre esta propiedad, tanto en el miocardio oxigenado como en el sometido a isquemia regional aguda.

Previamente a la oclusión coronaria, vimos que hubo diferencias de heterogeneidad entre los corazones procedentes de los conejos entrenados y los controles. Efectivamente, cuando analizamos la dispersión de los intervalos VV, es decir, de los ciclos fibrilatorios, ya describimos en el capítulo de resultados que previamente a la oclusión coronaria, ésta, expresada como CV de los intervalos VV, fue menor en el grupo entrenado que en el grupo control. Asimismo al comparar el grupo tratado con glibenclamida con el control, este valor fue significativamente menor en el tratado.

Al comparar el coeficiente de variación de la FD durante la FV del grupo entrenado con el control, previamente a la oclusión coronaria, encontramos que el menor valor numérico del mismo en el grupo entrenado, no obstante, no llegó a alcanzar significación estadística al compararlo con el grupo control. En relación a que el coeficiente de variación de la FD durante la FV no llegara a ser significativamente diferente al comparar control y entrenado, pensamos que la desviación estándar de la FD durante la FV ha enmascarado las posibles diferencias entre el grupo control y el entrenado. En el caso del coeficiente de variación del PRFFV, el valor del mismo previamente a la oclusión coronaria, aconteció del mismo modo que para el CV de la FD durante la FV, al comparar el valor del grupo entrenado con el del grupo control.

Los resultados en relación al coeficiente de variación del ciclo fibrilatorio son coincidentes con los obtenidos en otros trabajos de investigación en los que se analizó el coeficiente de variación de la frecuencia dominante durante la fibrilación (Pelechano et al., 2007; Parra et al., 2012), y que nos informarían acerca de un posible efecto del ejercicio físico crónico sobre la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio en condiciones normales. No obstante, esta interpretación requiere una cierta cautela habida cuenta de la falta de significación estadística del CV del PRFFV y del CV de la FD durante la FV entre el grupo control y el entrenado.

Acogiéndonos al resultado obtenido en el caso de los intervalos diastólicos durante la FV, si bien desconocemos el mecanismo por el cual el entrenamiento físico puede operar sobre este parámetro de heterogeneidad fisiológica del miocardio, queremos apuntar algunas consideraciones. La dispersión local de la refractariedad (recuérdese que los intervalos citados están muy relacionados con la misma) es un hallazgo normal del miocardio ventricular. En algunos animales, como en el caso del perro, se han encontrado diferencias en lo que a refractariedad se refiere, a frecuencias cardiacas normales, de aproximadamente 40 ms (Janse et al., 1969; Janse, 1971; citados por Kléber & Rudy, 2004). Los mecanismos propuestos para explicar la citada heterogeneidad han sido la heterogeneidad intrínseca en cuanto a tipos celulares se refiere, que expresan un espectro diferente de canales repolarizantes de potasio, canales tardíos de sodio e intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, entre otros. Aunque la dispersión espacial de gradientes reviste una importancia crucial en los procesos de iniciación de reentradas, las investigaciones en este campo se han

descrito como escasas hasta hace relativamente poco tiempo (Allessie et al., 1976; citados por Kléber & Rudy, 2004). Asimismo, se han descrito clásicamente heterogeneidades fisiológicas en la conducción del impulso eléctrico que afectan a la velocidad de propagación. Nosotros pensamos, aunque de modo algo especulativo, que el entrenamiento ha modificado de modo homogéneo, en el corazón en situación de normoxia, aquellos mecanismos implicados en propiedades tales como la refractariedad y la velocidad de conducción; y nos referimos a los canales y sistemas de transporte antes mencionados, y quizás a las mismas propiedades de las membranas como cable.

A excepción de investigaciones realizadas por nuestro grupo (Pelechano et al., 2007; Parra et al., 2012), y por otros autores, aunque en situaciones fisiopatológicas en este último caso (Hajnal et al., 2005), hemos encontrado a penas alguna referencia en la literatura sobre el efecto del entrenamiento a nivel de la heterogeneidad fisiológica en el miocardio normalmente oxigenado. En cualquier caso interpretamos este efecto como beneficioso desde el punto de vista de la facilidad o dificultad para la instauración, mantenimiento y cese de las arritmias reentrantes. Efectivamente, es clásicamente conocida la importancia de la heterogeneidad y de la refractariedad en la inducción de la fibrilación cardíaca (Han & Moe, 1964). Por tanto, ofrecemos un dato que, a la luz de los conocimientos actuales sobre los mecanismos básicos por los que el ejercicio físico crónico ejerce un efecto protector frente a la muerte súbita, parece especialmente interesante.

Resaltamos, por otra parte, que en el grupo tratado con glibenclamida, la heterogeneidad, como expresión de los parámetros indicadores de la misma (coeficiente de variación, de la frecuencia dominante durante la FV, del PRFFV y de los intervalos VV) fue menor que en el grupo control, cuando se comparó con dicho grupo, previamente a la oclusión arterial coronaria. Cuando comparamos este parámetro entre el grupo tratado y el entrenado no encontramos diferencias significativas, previamente a la instauración de isquemia regional. En este sentido, en los estudios citados en el apartado introductorio de la presente tesis, no se ha descrito ningún cambio electrofisiológico producido por la glibenclamida en situación no isquémica, ya que sus efectos se ligan al bloqueo del canal K_{ATP} , que cobra un relevante papel durante la isquemia, cuando la relación ATP/ADP es más baja, no limitando la apertura del citado canal. No obstante, existen algunos estudios que han demostrado que la acción de la glibenclamida podría no estar ligada al canal K_{ATP} y a la isquemia miocárdica. Un estudio realizado en corazones aislados y perfundidos de rata sometidos a FV demostró que la glibenclamida ejercía una acción desfibrilatoria, mejorando la función cardíaca post-FV independientemente del canal K_{ATP} (Csonka et al., 2003). En un modelo de arritmia miocárdica con isquemia-reperfusión en ratas, en el que se estudió el papel de los canales K_{ATP} sobre el efecto antiarrítmico de la endotoxina de *E. coli*, se demostró que la glibenclamida inhibía el efecto antiarrítmico de esta endotoxina no pareciendo tener relación con los canales K_{ATP} (Iskit et al., 2007). Asimismo, nuestro grupo de investigación, utilizando la misma metodología empleada en la presente tesis sobre corazones aislados y perfundidos (bien oxigenados) de conejo, ya demostró que aunque

no existían diferencias significativas en el CV del PRFFV entre el grupo control y el tratado con glibenclamida, existía una tendencia ($p=0,08$) en el descenso del CV del PRFFV por la glibenclamida (del-Canto et al., 2012b). Estas consideraciones plantean la posibilidad de que la glibenclamida haya actuado, previamente a la oclusión coronaria, a través de algún otro mecanismo que no fuera el canal K_{ATP} .

En relación a la heterogeneidad electrofisiológica, expresada como coeficiente de variación de los intervalos VV durante la FV, describimos en el capítulo de resultados que, posteriormente a la oclusión coronaria, el parámetro citado aumentó en el grupo control y en el entrenado, y se mantuvo sin modificaciones significativas en el grupo tratado, cuando la comparación se hizo entre el valor previo a la ligadura y el valor posterior a la misma en la zona más afectada por la oclusión coronaria (medido ésta con un criterio electrofisiológico). Si la comparación se realizaba frente a toda la zona subsidiaria de la coronaria ligada, el incremento del CV de los intervalos VV se produjo en los tres grupos. Si bien no hubo diferencias entre grupos cuando el análisis se realizó con el dato de dispersión correspondiente a toda la zona miocárdica abarcada por la placa multielectrodo, sí hubo una tendencia hacia una menor dispersión de los intervalos VV en el grupo tratado con glibenclamida respecto al control ($p=0,08$) cuando este parámetro se analizó en las zonas del miocardio isquémico que exhibieron mayor daño. El incremento del CV de los intervalos VV tras la oclusión coronaria, en el grupo entrenado (que no sigue el mismo comportamiento que se ha dado en otros parámetros de heterogeneidad) indica que la heterogeneización a nivel de este

parámetro, producida por la agresión isquémica no parece mitigarse significativamente con el entrenamiento, lo que si parece haber ocurrido por el bloqueo del canal K_{ATP} , ya que como acabamos de comentar, el incremento del CV en el grupo tratado no fue significativamente mayor tras la oclusión. No obstante, este último resultado hay que interpretarlo con una importante cautela, ya que podría ser debido a que en el miocardio tratado con el bloqueante el grado de deterioro metabólico fuera mayor, como parecen apuntar alguno de los resultados del presente trabajo y otros recogidos en estudios previos (McPherson et al., 1993; Garlid et al., 1997). Por ello, en un tejido más deteriorado podríamos encontrar, paradójicamente, unas heterogeneidades menores (“en tejido muerto, heterogeneidad electrofisiológica cero”).

En relación al análisis de la dispersión de los periodos refractarios funcionales tras la ligadura coronaria, si bien no hubo diferencias entre grupos cuando el análisis se realizó con el dato de dispersión correspondiente a toda la zona miocárdica abarcada por la placa multielectrodo, sí hubo una clara tendencia hacia una menor heterogeneidad o menor dispersión del PRFFV en el grupo entrenado respecto al control ($p=0,06$) cuando este parámetro se analizó en las zonas del miocardio isquémico que exhibieron mayor daño. La oclusión arterial coronaria no afectó a la dispersión del PRFFV en ningún grupo, a excepción del entrenado, en el que encontramos una disminución del CV del PRFFV.

En relación a la heterogeneidad electrofisiológica, expresada como coeficiente de variación de la frecuencia dominante durante la

FV, vimos, en el capítulo de resultados, que posteriormente a la oclusión coronaria, el parámetro citado aumentó en el grupo control y se mantuvo sin modificaciones significativas en los grupos entrenado y tratado, cuando la comparación se hizo entre el valor previo a la ligadura y el valor posterior a la misma en la zona más afectada por la oclusión coronaria. Si la comparación se realizaba frente a toda la zona subsidiaria de la coronaria ligada, el incremento del CV de la FD se produjo en los tres grupos. No hubo diferencias entre grupos cuando el análisis se realizó con el dato de dispersión correspondiente a toda la zona miocárdica abarcada por la placa multielectrodo. Sí hubo una menor dispersión de la FD en el grupo tratado con glibenclamida respecto al control cuando este parámetro se analizó en las zonas del miocardio isquémico que exhibieron mayor daño. Los razonamientos empleados para comentar los resultados del CV de los intervalos VV en el caso del grupo tratado, son los mismos para este caso.

El mantenimiento del CV en la zona más dañada se interpreta como un efecto beneficioso antiarritmogénico, dado el hecho conocido ya comentado anteriormente, por el que se atribuye a la heterogeneidad eléctrica un papel fundamental en la aparición y perpetuación de las arritmias por reentrada (Han & Moe, 1964). Si bien nosotros no hemos investigado el mecanismo básico por el cual en los corazones procedentes de conejos entrenados parece disminuir la heterogeneidad, en las zonas de mayor daño isquémico, otros investigadores han implicado al óxido nítrico, habiendo obtenido resultados similares, aunque en el modelo canino (Hajnal et al., 2005). Por lo tanto, nuestro resultado está en consonancia con las

investigaciones en las que ha sido descrito un efecto protector del ejercicio físico crónico sobre la heterogeneidad miocárdica producida por la oclusión arterial coronaria (Babai et al., 2002; Hajnal et al., 2005).

La similitud en el comportamiento del grupo entrenado y del tratado permite, contrariamente a lo que ha ocurrido en otros parámetros, hacer pensar en la posibilidad de que el entrenamiento haya podido operar a través del bloqueo del canal K_{ATP} . Efectivamente, los efectos del entrenamiento, así como los debidos a la administración de glibenclamida, a nivel de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio parecen coincidir tras la oclusión arterial coronaria; si bien los efectos de la glibenclamida se han manifestado sobre un parámetro y el entrenamiento sobre otro, ambos parámetros lo son de heterogeneidad electrofisiológica miocárdica. Las razones por las que no se llega a alcanzar significación con un parámetro (dispersión de la FD durante la FV) para un grupo y sí para otro, y la misma situación se da para la dispersión de los periodos refractarios funcionales, podría estar ligada a: (1) la necesidad de incrementar el número de experimentos, dado que las diferencias que vimos tampoco eran cuantitativamente muy importantes; (2) que la medición de los parámetros citados no está exenta de subjetividad ya que se basa, en última instancia, en el análisis de los intervalos del ciclo fibrilatorio, lo que requiere un marcado de los trazados que no es totalmente automático, tal y como hemos descrito en el apartado de "material y métodos". El método usado ha sido semiautomático, en el que el investigador escoge el trazado sobre el que el programa ejecutará el marcado definitivo; ello, pensamos que puede haber

tenido alguna influencia, y ha sido precisamente lo que nos ha llevado a diseñar un detector para marcado automático definitivo y que estamos comenzando a usar y perfeccionar.

Así pues, no parece estar totalmente claro que a este nivel el ejercicio crónico opere a través del bloqueo del canal, ya que sus efectos, analizando los resultados, no son del todo coincidentes con el grupo tratado con glibenclamida. Queda planteada la cuestión que nos ha de llevar a subsanar aspectos metodológicos y así proseguir esta investigación.

4.3.2. Respecto a la complejidad de la activación eléctrica.

Dado que el ejercicio físico crónico puede actuar sobre una serie de propiedades y/o parámetros como son la refractariedad y la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio, cabe la posibilidad de que, por tanto, modifique el proceso de activación miocárdica durante la FV (Chorro et al., 2000c). Este planteamiento ha formado parte de nuestra hipótesis de trabajo, según la cual el ejercicio físico disminuye la complejidad del proceso de activación eléctrica del miocardio ventricular en situación de normoxia, como tras isquemia regional aguda, y que dicho efecto, en el caso del miocardio isquémico, podría estar mediado por el bloqueo del canal K_{ATP} .

En el modelo de FV sin interrumpir la perfusión, como el usado en la presente tesis, el análisis del proceso de activación durante la arritmia, es un valioso instrumento que nos permite obtener información indirecta sobre los parámetros en que se asienta la

complejidad de la activación eléctrica durante la FV, como son la velocidad de conducción, la excitabilidad, la refractariedad y la longitud de onda (Massé et al., 2009). Queremos hacer énfasis en que la información obtenida no especifica el parámetro concreto que modificándose implica cambios en la complejidad de los mapas de activación.

En relación al efecto del ejercicio físico crónico sobre la complejidad del proceso de activación en el corazón aislado y sometido a perfusión normalmente oxigenada, como vimos en el apartado de resultados, se evidenció que los corazones de los animales entrenados exhibieron un nivel de complejidad menor en todo el miocardio ventricular. Estos cambios son probablemente, tal y como acabamos de mencionar, el resultado de la compleja interacción entre la velocidad de conducción, la excitabilidad, la refractariedad y la longitud de onda. Esta disminución de la complejidad de la activación por la realización de ejercicio físico, se interpreta como un efecto beneficioso que indica un incremento de la estabilidad eléctrica del miocardio ventricular a través de la realización del ejercicio físico crónico. Este efecto beneficioso se asienta y se suma al acontecido con la refractariedad y con los otros efectos derivados del análisis de la fibrilación en el dominio del tiempo.

En lo que respecta a los corazones sometidos a bloqueo del canal K_{ATP} , estos exhiben un nivel de complejidad menor en condiciones de perfusión normalmente oxigenada en todo el miocardio ventricular cuando comparamos al grupo tratado con el grupo control. La interpretación de este resultado nos resulta altamente compleja, ya

que si bien es cierto que tras la isquemia regional dicho resultado sería fácilmente interpretable, ya que en tal situación se activa el canal K_{ATP} , heterogeneiza electrofisiológicamente al tejido, lo que cabe pensar que lleve a una mayor complejidad de la activación ventricular, el efecto de la glibenclamida en situación de normoxia no se puede interpretar bajo el punto de vista que acabamos de señalar. Por tanto, otros efectos que no son el bloqueo del canal K_{ATP} podrían estar implicados (Csonka et al., 2003). En este sentido, ha sido relatado que los efectos de la glibenclamida no están únicamente relacionados con su acción sobre el canal K_{ATP} . Tominaga et al. (1995) describieron que la glibenclamida inhibía la conductancia al cloruro en los miocitos ventriculares del cobayo, ejerciendo de este modo un efecto antiarrítmico. Se ha descrito que la glibenclamida estimulaba la producción de lactato durante la perfusión normóxica (Wilde et al., 1990) y atenuaba el incremento de la producción de lactato durante la hipoxia (Venkatesh et al., 1991). Rees y Curtis (1995) observaron que la glibenclamida amplió el intervalo QT y causó bradicardia sinusal durante isquemia regional. Este efecto de la glibenclamida no fue antagonizado por el abridor del canal K_{ATP} RP 49356. Picard et al. (1998) vieron que la glibenclamida impidió la liberación del ácido araquidónico de la membrana inducida por la reperfusión. Todas estas acciones mencionadas, K_{ATP} independientes, de la glibenclamida pueden contribuir a sus efectos sobre la complejidad de la activación en el corazón aislado y sometido a perfusión normalmente oxigenada.

Cuando analizamos la complejidad de la activación del subepicardio durante la FV tras la oclusión coronaria, observamos que ni en el grupo control, ni en el grupo entrenado hubo diferencias en

dicho parámetro entre el valor previo a la oclusión y el posterior a la misma. Asimismo, al comparar la complejidad entre el control y el entrenado tras la oclusión no hubo diferencias.

Que en el miocardio sometido a isquemia regional aguda no aumentara la complejidad de la activación durante la FV, teniendo en cuenta que nosotros valoramos la complejidad por el número de eventos o tipos de activación, podría estar relacionado con el hecho de que la velocidad de conducción disminuye en el miocardio isquémico (Parra et al., 2010; Parra, 2011) lo que podría disminuir la frecuencia de activación. También el aumento del periodo refractario que se produjo en el grupo control tras la oclusión coronaria puede influir en la disminución de la frecuencia de activación. Estos parámetros podrían contrarrestar, al menos en parte, los efectos de la ruptura de frentes que se producen en el miocardio isquémico (Bradley et al., 2011), que contribuyen en opinión de estos autores al incremento de la complejidad de activación que nosotros no hemos encontrado. Algunos estudios han demostrado un incremento de la complejidad de la activación tras la isquemia. Así, se ha demostrado en corazones humanos fibrilando sometidos a cirugía cardíaca, que durante la isquemia global la frecuencia dominante media durante la FV disminuyó rápidamente, mientras que, el promedio de singularidades de fase epicárdicas aumentó, así como el número de frentes de onda (Bradley et al., 2011). Sin embargo, esta observación no se produce en todos los corazones de nuestro estudio, atribuyéndolo al hecho de que en nuestro estudio, se ha practicado una oclusión coronaria que origina un isquemia regional, y por tanto, la zona investigada incluye miocardio afectado por la oclusión coronaria

y miocardio ventricular no isquémico. También cabe tener en cuenta la posibilidad de que el tiempo de oclusión coronaria, en nuestro modelo experimental, no haya “situado” a los corazones dentro de la llamada fase de aperiodicidad: fase dentro de los 3 a los 10 minutos de la oclusión coronaria caracterizada por una gran variabilidad de los potenciales de acción, alto nivel de ruptura de frentes y baja recurrencia de dirección de propagación (Huizar et al., 2007).

La ausencia de diferencias entre el grupo control y el entrenado la interpretamos como que las consecuencias electrofisiológicas de la agresión isquémica, en lo que respecta a la complejidad de activación, no han podido ser mitigadas por la aplicación del protocolo de entrenamiento, como en cambio sí que esta intervención ha operado beneficiosamente a nivel de otros parámetros electrofisiológicos comentados anteriormente.

El análisis cuantitativo de la complejidad durante la FV tras producir isquemia regional aguda, ha podido evidenciar que en el grupo en el que se ha bloqueado el canal K_{ATP} con glibenclamida se produce una disminución significativa de la complejidad de la activación miocárdica durante la isquemia. Estos resultados sobre el efecto del bloqueo del canal K_{ATP} con glibenclamida, tras la oclusión coronaria, en el sentido de que ha disminuido la complejidad de la activación, en relación al grupo control y al grupo entrenado, son de difícil interpretación y hasta incluso pueden ser de interpretación contradictoria. Decimos esto porque si bien la disminución de la complejidad de la activación, además de suponer una mayor estabilidad electrofisiológica y por tanto ser una defensa frente a los

procesos reentrantes, y haber podido fundamentarse en un proceso de fusión de frentes y regularización u homogeneización de las propiedades que subyacen a la mayor o menor complejidad de activación, también esta disminución de la complejidad puede ser una manifestación de un proceso de mayor deterioro del tejido miocárdico isquémico. Es aquello que podríamos expresar coloquialmente como “en tejido muerto, complejidad de activación cero”. Lo que sí que hemos evidenciado claramente es que en el grupo tratado con el bloqueante del canal K_{ATP} , la frecuencia de activación durante la fibrilación cayó dramáticamente tras la oclusión coronaria, y en este sentido se comportó como lo hizo el grupo de corazones control (Such-Miquel et al., 2007). Precisamente, aunque en el presente trabajo no hemos realizado un estudio de la FV en el dominio de la frecuencia, sí lo hemos hecho en el dominio del tiempo, habiendo encontrado resultados que en esencia son similares a los que acabamos de mencionar para la frecuencia de activación durante la FV. Como hemos señalado en líneas más arriba, la oclusión coronaria ha ido acompañada de un incremento de la refractariedad en el grupo tratado con glibenclamida que hemos interpretado como un signo de deterioro, y es por esta razón planteamos el hecho de que la disminución de la complejidad de la activación eléctrica durante la FV, aún siendo un efecto potencialmente antiarrítmico, puede, no obstante, estar ligado al propio signo de deterioro. En tal sentido, el bloqueo del canal K_{ATP} tras la oclusión coronaria no ha exhibido un efecto protector directo. Así pues, de modo similar al comentario que hicimos en relación a las similitudes entre el efecto del ejercicio físico crónico y el bloqueo del canal K_{ATP} , éstas no parecen darse para el parámetro que acabamos de comentar.

4.4. Limitaciones del estudio.

El estudio se basa en el análisis de determinadas características de la FV inducida sin interrumpir la perfusión; con ello podemos determinar la refractariedad, su dispersión y la complejidad de la activación durante la arritmia. El registro del proceso fibrilatorio se ha realizado por medio de un electrodo múltiple que se aplica al epicardio del ventrículo izquierdo, pero la activación ventricular se produce en un medio tridimensional (Chorro et al., 2000b) y según lo que acabamos de comentar los estudios basados en registros de los electrogramas mediante electrodos múltiples, limita el análisis del proceso a las capas más superficiales de las paredes ventriculares y al área abarcada por el electrodo, asumiendo que pueden quedar fuera del análisis parte de información o fenómenos que ocurren en áreas mesocárdicas y endocárdicas a las que no se ha podido acceder en el presente estudio.

El trazado electrográfico registrado durante la FV ha sido tratado para la realización de su análisis en el dominio del tiempo y con ello proceder a la determinación de los diferentes parámetros anteriormente citados. Para ello se debe proceder a un proceso de marcado semiautomático, en el que el investigador ha de elegir las características adecuadas de la señal para ubicar la marca, que de modo automático, se situará donde proceda, basándose esto en un proceso de identificación de la pendiente máxima negativa (dv/dt). En algunos trazados han habido tramos irregulares, donde no habían pendientes bien definidas. Esto último le da al método un cierto grado de subjetividad en la identificación de las ondas, que puede

distorsionar, al menos en parte, los resultados. Sin embargo, aplicando por igual unos criterios concretos de marcaje, expuestos en el apartado de material y métodos, para todos los registros de FV de cada grupo, se ha conseguido que las posibles diferencias observadas en los parámetros electrofisiológicos que se han determinado *a posteriori* dependan en la mínima medida de este proceso, y se deban mayoritariamente, a las diferentes intervenciones experimentales practicadas en la investigación

Probablemente la causa de las malas señales está ligada a malos contactos, ya que la placa multielectrodo usada no siempre se adapta en toda su extensión a la convexidad del ventrículo, pese a que esta placa se construyó con una forma cóncava. No obstante, y a pesar de esta limitación, el estudio de la FV mediante la utilización de electrodos múltiples, ha permitido describir y conocer con bastante precisión diversos aspectos del proceso fibrilatorio ventricular, como así se ha podido demostrar en gran número de investigaciones y de publicaciones previas realizadas por nuestro grupo (Chorro et al., 2000b; Chorro et al., 2000c; Chorro et al., 2002a; Chorro et al., 2003; Chorro et al., 2005; Orts, 2007; López, 2008; Pelechano, 2008; Trapero et al., 2008; Chorro et al., 2009).

Por otro lado, para la obtención del PRFFV, como ha sido descrito anteriormente, nos hemos basado en la determinación del percentil 5 del histograma de las longitudes de ciclo durante la FV. Este método, al igual que otros investigados, todos ellos por Duytschaever et al. (2001), se correlacionó bien con el método de referencia (mediante el empleo de técnicas cartográficas), con la

ventaja sobre otros métodos (como el test del extra estímulo) de que no requería estimulación eléctrica sobre el miocardio.

La complejidad de la activación ventricular durante la FV se estudia sin que se produzca la subsiguiente isquemia que ocurre en el ser humano en el momento en que se desencadena la arritmia. Por tanto, las alteraciones correspondientes a las propiedades sobre las que se asienta la complejidad de la activación eléctrica, por efecto de la isquemia aguda, están ausentes en el presente modelo.

En relación a la técnica usada para el aislamiento y perfusión del corazón, hay que decir que a pesar de las importantes ventajas que supone este tipo de preparación (desconectar el corazón de influencias nerviosas y/o humorales), esta técnica queda un poco alejada de la fisiología normal ya que no trabaja contra una poscarga y, solamente, el ventrículo derecho ha de trabajar con una ligerísima precarga que supone el fluido procedente de la circulación coronaria que previamente habría desembocado en la aurícula derecha. La baja capacidad de transporte de oxígeno, habida cuenta de que no hay proteína de transporte en el líquido nutricio, hace que se requieran flujos coronarios anormalmente altos (ver revisión de Riascos et al., 2004).

Finalmente, el hecho de que el estudio se haya realizado en corazón aislado de otra especie de mamífero obliga a interpretar los resultados, desde el punto de vista traslacional, con una importante cautela.

4.5. Consideraciones finales respecto a los resultados obtenidos. Posibles implicaciones del presente estudio en el área de la salud.

La realización de ejercicio físico crónico parece actuar sobre la refractariedad miocárdica ventricular, la heterogeneidad y las propiedades sobre las que se asienta la complejidad de activación eléctrica del corazón durante la fibrilación ventricular en un sentido protector antiarrítmico, en condiciones de normoxia, y puede contribuir a explicar, al menos en parte, el efecto protector del ejercicio físico crónico frente a la muerte súbita cardiaca. En la isquemia aguda, la realización de ejercicio físico crónico parece mantener al miocardio ventricular en mejores condiciones desde el punto de vista funcional y en lo referente a las alteraciones que generan arritmias. Si bien los efectos no son de gran magnitud, sí permiten afirmar que el hecho de que se manifiesten en el corazón aislado y por tanto no sometido a influencias nerviosas extrínsecas ni humorales, permite otorgarles el carácter de intrínsecos; todo ello tiene un interesante correlato en el campo de la fisiología y de la fisiopatología cardiovascular.

El presente trabajo de investigación tiene especial interés, no solamente desde el punto de vista básico de la fisiología y fisiopatología, sino también, más a largo plazo y en relación con las arritmias cardíacas que se hallan implicadas en la mortalidad de origen cardíaco (Paffenbarger & Hale, 1975; Ekelund et al., 1988; Blair et al., 1996), como es la FV, causa principal de muerte súbita de origen cardíaco (Billman, 2002), y su posible abordaje preventivo no

farmacológico a través de la realización de ejercicio físico aeróbico de resistencia.

En cuanto a que si los efectos del ejercicio físico crónico observados por nosotros son debidos al bloqueo del canal K_{ATP} durante la isquemia, no se pueden ofrecer resultados concluyentes, ya que si bien algunos datos parecen hallarse más ligados a un posible bloqueo del mencionado canal, otros resultados, por el contrario, parecen apuntar a una apertura del canal K_{ATP} como sostienen la mayor parte de los autores. Efectivamente, hemos obtenido resultados que indican un efecto electrofisiológico protector, en lo que al mantenimiento del miocardio más difícilmente vulnerable a las arritmias reentrantes, tras el bloqueo del canal K_{ATP} , tal y como un importante número de investigadores relatan (Di Diego & Antzelevitch, 1993; Jew & Moore, 2001; Jew & Moore, 2002; Aronson et al., 2003; Vajda et al., 2007; Farid et al., 2011; Fedorov et al., 2011). Sin embargo, otros resultados como es el incremento de la refractariedad y la disminución de la frecuencia dominante tras la oclusión coronaria, indican indirectamente que el bloqueo del citado canal deteriora metabólicamente al miocardio isquémico.

Nuestros resultados, en cualquier caso, plantean la necesidad de realizar y proseguir estas investigaciones, cuya finalidad es establecer todos los mecanismos por los cuales la realización regular de ejercicio físico aeróbico ejerce un efecto protector frente a la muerte súbita de origen cardiaco.

CAPÍTULO 5

Conclusiones

Hemos realizado un estudio, en corazón aislado de conejo, perfundido y en fibrilación ventricular (sin interrumpir la perfusión), acerca de los efectos del ejercicio físico crónico sobre las modificaciones intrínsecas de la refractariedad ventricular (a través del análisis de diversos parámetros relacionados con la misma), de la heterogeneidad ventricular y de la complejidad de la activación eléctrica durante la arritmia, en situación de normoxia y tras isquemia regional aguda. Asimismo, hemos investigado, en el mismo modelo experimental, el efecto de la administración del inhibidor del canal K_{ATP} , glibenclamida, con el fin de comparar los efectos electrofisiológicos del bloqueo del citado canal con los del entrenamiento, y ver las posibles similitudes o, por el contrario, diferencias entre los grupos entrenado y tratado con glibenclamida. Esto último, ha ido dirigido a dilucidar, al menos en parte, la cuestión de si el ejercicio físico crónico ejerce su papel protector a través de la apertura del canal K_{ATP} o, por el contrario, a través de su bloqueo.

De los resultados obtenidos en nuestro modelo de corazón aislado de conejo y sometido a perfusión normalmente oxigenada, podemos concluir que el efecto beneficioso del ejercicio físico crónico:

- 1.** Podría ser debido al incremento de la refractariedad miocárdica ventricular intrínseca, lo que fundamentamos por los resultados obtenidos en los parámetros de refractariedad analizados.
- 2.** Podría ser debido a la disminución de la heterogeneidad electrofisiológica miocárdica, como así ha ocurrido en uno de los parámetros indicadores de esta propiedad analizados.

3. Podría relacionarse con la disminución de la complejidad de la activación eléctrica del miocardio ventricular, lo que ha sido observado por nosotros y está en sintonía con las dos anteriores conclusiones, habida cuenta de que la complejidad de activación se halla relacionada con las propiedades a las que hacen referencia.

De los resultados obtenidos en nuestro modelo de corazón aislado de conejo, perfundido y sometido a isquemia regional aguda, podemos concluir que el efecto beneficioso del ejercicio físico crónico:

4. Podría ser debido a una mejor preservación morfo-funcional del miocardio isquémico, a la vista de los resultados sobre la refractariedad que indican un mejor mantenimiento de dicha propiedad en los animales entrenados.

5. Podría relacionarse con una disminución de la heterogeneidad electrofisiológica, manifestada por una menor dispersión de los periodos refractarios funcionales en el grupo entrenado en relación al grupo control, y un mantenimiento de la dispersión de la frecuencia durante la fibrilación, en el grupo entrenado, tras la oclusión coronaria, al analizar la zona de mayor daño isquémico,

Las conclusiones que se desprenden del tratamiento con el bloqueante del canal K_{ATP} son que:

6. El ejercicio físico crónico no parece actuar modificando el canal K_{ATP} , en la condición de normoxia, dados los resultados referentes a la refractariedad, ya que esta propiedad no varió tras el bloqueo del

citado canal. Esta conclusión se halla en consonancia con lo que se sabe sobre en qué condiciones está operativo dicho canal.

7. El ejercicio físico crónico no parece actuar bloqueando el canal K_{ATP} , en la condición de isquemia, dados los resultados referentes a la refractariedad, al comparar la evolución de los parámetros relacionados con esta propiedad (intervalos VV y percentil 5 de los mismos) tras la oclusión, entre el grupo entrenado (en el que se mantuvo estable) y el tratado con glibenclamida (en el que hubo un incremento que interpretamos como signo de deterioro).

8. Aunque no hay una muy estrecha similitud en cuanto a la heterogeneidad electrofisiológica, tras la oclusión coronaria, entre el grupo entrenado y el tratado con glibenclamida, sí hay un comportamiento similar, ya que si el entrenado exhibe una menor dispersión de los periodos refractarios funcionales, tal significación la exhibe el grupo tratado con glibenclamida para la dispersión de la frecuencia dominante durante la fibrilación.

9. Al igual que ocurrió previamente a la oclusión coronaria, el grupo tratado con glibenclamida ha exhibido una menor complejidad de la activación eléctrica del corazón durante la fibrilación ventricular tras la oclusión. El hecho de que la complejidad de la activación, tras la oclusión coronaria, fuera menor en el grupo tratado que en el entrenado, parece indicar que tampoco en este parámetro el ejercicio físico crónico haya operado a través del bloqueo del canal K_{ATP} .

10. El hecho de que la administración del bloqueante del canal K_{ATP} , glibenclamida, haya producido modificaciones (disminución de la heterogeneidad electrofisiológica y de la complejidad de la activación eléctrica durante la fibrilación ventricular respecto a control), previamente a la oclusión coronaria, plantea la posibilidad de que esta sustancia haya ejercido otras acciones que no solamente el bloqueo del canal K_{ATP} , ya que esto último no debería modificar, en situación de normoxia, los parámetros citados.

Podemos concluir, de modo general, que las modificaciones electrofisiológicas intrínsecas producidas por el ejercicio físico regular exhiben un carácter beneficioso frente a la posibilidad de instauración de arritmias reentrantes como la fibrilación ventricular, principal causa de muerte súbita cardiaca. Sin embargo, como se desprende de las anteriores conclusiones, no parece que el ejercicio físico crónico, en algunos parámetros, haya operado mediante el bloqueo del canal K_{ATP} ; antes bien, parecería que ha operado en sentido contrario. Sin embargo, por el comportamiento del bloqueo a nivel de otros parámetros, sí parece que el ejercicio físico crónico parece que opere a través del citado bloqueo. En cualquier caso, no podemos concluir que el ejercicio físico crónico opere, a todos los niveles, bloqueando el canal K_{ATP} .

CAPÍTULO 6

**Referencias
bibliográficas**

Allessie MA, Bonke FIM, & Schopman FJC. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. II. The role of nonuniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block as studied with multiple microelectrodes. *Circ Res.* 39(2):168–177, 1976.

Alves C, Soler C, Brines L, Del Canto I, Such-Miquel L, Zarzoso M, Parra G, Alberola A, Chorro FJ, Tomás N, & Such L. ATP-potassium channel opening facilitates ventricular fibrillation inducibility and difficults its reversion in isolated rabbit heart. En prensa.

Aronson D, Mittleman MA, & Burger AJ. Effects of sulfonylurea hypoglycemic agents and adenosine triphosphate dependent potassium channel antagonists on ventricular arrhythmias in patients with decompensated heart failure. *Pacing Clin Electrophysiol.* 26(5):1254–1261, 2003.

Ascensão A, Ferreira R, & Magalhães J. Exercise-induced cardioprotection-biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol.* 117(1):16–30, 2007.

Ashcroft FM, Harrison DE, & Ashcroft SJ. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature.* 312(5993):446–448, 1984.

Ashford ML, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ, & Hales CN. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflugers Arch.* 412(3):297–304, 1988.

Babai L, Szigeti Z, Parratt JR, & Vegh A. Delayed cardioprotective effects of exercise in dogs are aminoguanidine sensitive: possible involvement of nitric oxide. *Clin Sci*. 102(4):435–445, 2002.

Bartels R, Menges M, & Thimme W. Effect of physical activity on incidence of sudden cardiac death. Study of the Berlin-Reinickendorf and Berlin-Spandau population. *Med Klin*. 92(6):319–325, 1997.

Berlin JA & Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol*. 132(4):612–628, 1990.

Billman GE. The effect of carbachol and cyclic GMP on susceptibility to VF. *FASEB J*. 4(6):1668–1673, 1990.

Billman GE. Role of ATP sensitive potassium channel in extracellular potassium accumulation and cardiac arrhythmias during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res*. 28(6):762–769, 1994.

Billman GE, Englert HC, & Schoelkens BA. HMR 1883, a novel cardioselective inhibitor of the ATP-sensitive potassium channel. Part II: effects on susceptibility to ventricular fibrillation induced by myocardial ischemia in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 286(3):1465–1473, 1998.

Billman GE. Aerobic exercise conditioning: a nonpharmacological antiarrhythmic intervention. *J Appl Physiol*. 92(2):446–454, 2002.

Billman GE, Kukielka M, Kelley R, Moustafa-Bayoumi M, & Altschuld RA. Endurance exercise training attenuates cardiac beta2-adrenoceptor responsiveness and prevents ventricular fibrillation in animals susceptible to sudden death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(6):H2590–H2599, 2006.

Billman GE & Kukielka M. Effect of endurance exercise training on the heart rate onset and heart rate recovery responses to submaximal exercise in animal susceptible to ventricular fibrillation. *J Applied Physiol.* 102(1):231–240, 2007.

Billman GE. The cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel as a novel target for anti-arrhythmic therapy. *Pharmacol Ther.* 120(1):54–70, 2008.

Bjornstad H, Storstein L, Dyre Meen H, & Hals O. Electrocardiographic findings of heart rate and conduction times in athletic students and sedentary control subjects. *Cardiology.* 83(4):258–267, 1993.

Blair S, Kampert J, Kohl H, Barlow C, Macera C, Paffenbarger R, & Gibbons L. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular diseases and all-causes mortality in men and women. *JAMA.* 276(3):205–210, 1996.

Bradley CP, Clayton RH, Nash MP, Mourad A, Hayward M, Paterson DJ, & Taggart P. Human ventricular fibrillation during global ischemia and reperfusion: paradoxical changes in activation rate and wavefront complexity. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 4(5):684–691, 2011.

Brines L. Estudio de la participación de las neuronas colinérgicas miocárdicas sobre las modificaciones que el ejercicio físico crónico produce en la activación eléctrica y parámetros asociados, durante la fibrilación ventricular. Tesis doctoral. Universitat de València, 2014.

Brown CG & Dzwonczyk R. Signal analysis of the human electrocardiogram during ventricular fibrillation: frequency and amplitude parameters as predictors of successful countershock. *Ann Emerg Med.* 27(2):184–188, 1996.

Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, & Moore RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J Appl Physiol.* 95(6):2510–2518, 2003.

Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA, & Moore RL. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol.* 569(Pt 3):913–924, 2005.

Brown DA & O'Rourke B. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 88(2):241–249, 2010.

Caldwell J, Burton FL, Smith GL, & Cobbe SM. Heterogeneity of ventricular fibrillation dominant frequency during global ischemia in isolated rabbit hearts. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 18(8):854–861, 2007.

Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev.* 79(3):917–1017, 1999.

Chattipakorn N, Banville I, Gray RA, & Ideker RE. Mechanism of ventricular defibrillation for near-defibrillation threshold shocks. A whole-heart optical mapping study in swine. *Circulation.* 104(11):1313–1319, 2001.

Chattipakorn N, Shinlapawittayatorn K, & Chattipakorn S. Electrophysiological mechanisms of ventricular fibrillation induction. *Indian Pacing Electrophysiol J.* 5(1):43–50, 2005.

Chen PS, Swerdlow CD, Hwang C. & Karagueuzian HS. Current concepts of ventricular defibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 9(5):553–562, 1998.

Chorro FJ, Cánoves J, Guerrero J, Mainar L, Sanchis J, Such L, & López-Merino V. Alteration of ventricular fibrillation by flecainide, verapamil, and sotalol: an experimental study. *Circulation.* 101(13):1606–1615, 2000a.

Chorro FJ, Cánoves J, Guerrero J, Mainar L, Sanchís J, Llavador E, Such LM, López Merino V, & Such L. Cartografía epicárdica de la activación reentrante durante la fibrilación ventricular. Estudio experimental. *Rev Esp Cardiol.* 53(10):1356–1364, 2000b.

Chorro FJ, Cánoves J, Guerrero J, Mainar L, Sanchis J, Soria E, Such LM, Rosado A, Such L, & López-Merino V. Opposite effects of myocardial stretch and verapamil on the complexity of the ventricular fibrillatory pattern: an experimental study. *Pacing Clin Electrophysiol.* 23(11):1594–1603, 2000c.

Chorro FJ, Millet J, Ferrero A, Cebrián A, Cánoves J, Martínez A, Mainar L, Porres JC, Sanchis J, López Merino V, & Such L. Efecto del estiramiento miocárdico sobre las frecuencias de activación determinadas mediante análisis espectral durante la fibrilación ventricular. *Rev Esp Cardiol.* 55(11):1143–1150, 2002a.

Chorro FJ, Guerrero J, Ferrero A, Tormos A, Mainar L, Millet J, Cánoves J, Porres JC, Sanchis J, Lopez-Merino V, & Such L. Effects of acute reduction of temperature on ventricular fibrillation activation patterns. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283(6):2331–2340, 2002b.

Chorro FJ, Ferrero A, Cánoves J, Mainar L, Porres JC, Navarro A, Sanchis J, Millet J, Bodí V, López-Merino V, & Such L. Significance of the morphological patterns of electrograms recorded during ventricular fibrillation: an experimental study. *Pacing Clin Electrophysiol.* 26(5):1262–1269, 2003.

Chorro FJ, Trapero I, Guerrero J, Such LM, Cánoves J, Mainar L, Ferrero A, Blasco E, Sanchis J, Millet J, Tormos A, Bodí V, & Alberola A. Modification of ventricular fibrillation activation patterns induced by local stretching. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 16(10):1087–1096, 2005.

Chorro FJ, Guerrero J, Cánoves J, Trapero I, Mainar L, Pelechano F, Blasco E, Such-Miquel L, Ferrero A, Sanchis J, Bodí V, Cerdá JM, Alberola A, & Such L. Changes in the spectral characteristics of ventricular fibrillation in lesions produced by radiofrequency ablation. An experimental study. *Rev Esp Cardiol.* 61(4):394–403, 2008.

Chorro FJ, Trapero I, Such-Miquel L, Pelechano F, Mainar L, Cánoves J, Tormos A, Alberola A, Hove-Madsen L, Cinca J, & Such L. Pharmacological modifications of the stretch-induced effects on ventricular fibrillation in perfused rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297(5):1860–1869, 2009.

Chorro FJ, Pelechano F, Trapero I, Ibañez-Catalá X, Such-Miquel L, Tormos A, Guerrero J, Cánoves J, Mainar L, Millet J, Alberola A, & Such L. Modifications in ventricular fibrillation and capture capacity induced by a linear radiofrequency lesion. *Rev Esp Cardiol.* 65(2):143–151, 2011.

Clusin WT, Buchbinder M, Ellis AK, Kernoff RS, Giacomini JC, & Harrison DC. Reduction of ischemic depolarization by the calcium channel blocker diltiazem. Correlation with improvement of ventricular conduction and early arrhythmias in the dog. *Circ Res.* 54(1):10–20, 1984.

Cogolludo AL. Estudio de la vasodilatación inducida por la activación de la vía del NO/GMP, de los canales K_{ATP} y de la ATPasa Na^+/K^+ en arterias pulmonares y mesentéricas de lechón. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 2005.

Collins HL, Loka AM, & DiCarlo SE. Daily exercise-induced cardioprotection is associated with changes in calcium regulatory proteins in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(2):H532–H540, 2005.

Csonka C, Onody A, Csont T, & Ferdinandy P. Defibrillatory action of glibenclamide is independent from ATP-sensitive K⁺ channels and free radicals. *J Cardiovasc Pharmacol.* 41(6):916–922, 2003.

del-Canto I, Brines L, Such-Miquel L, Parra G, Gallego N, Soler C, Alberola A, Chorro FJ, Guerrero J, & Such L. Effect of physical training and IKATP blockade on the energy to reverse ventricular fibrillation in the regional myocardial ischemia. An experimental study. *Eur. Heart J.* 33(Suppl1055), 2012a.

del-Canto I, Gallego N, Soler C, Brines L, Koninckx M, Such-Miquel L, Parra G, Guerrero J, Barber J, Chorro FJ, Alberola A, & Such L. Study of the effect of IKATP blockade with glibenclamide on physiological heterogeneity of the ventricular myocardium. An experimental research. *Acta Physiologica.* 206(Suppl693):206, 2012b.

Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, & Naito H. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol.* 91(5):2205–2212, 2001.

Demirel HA, Hamilton KL, Shanely RA, Tumer N, Koroly MJ, & Powers SK. Age and attenuation of exercise-induced myocardial HSP72 accumulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285(4):H1609–H1615, 2003.

Díaz B. Efecto del ejercicio físico crónico sobre las características de la fibrilación ventricular, la refractariedad y el proceso de activación miocárdica durante la arritmia, en el corazón normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda. Tesis doctoral. Universitat de València, 2012.

Di Diego JM & Antzelevitch C. Pinacidil-induced electrical heterogeneity and extrasystolic activity in canine ventricular tissues. Does activation of ATP-regulated potassium current promote phase 2 reentry? *Circulation.* 88(3):1177–1189, 1993.

Dillon SM & Kwaku KF. Progressive depolarization: a unified hypothesis for defibrillation and fibrillation induction by shocks. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 9(5):529–552, 1998.

Duytschaever M, Mast F, Killian M, Blaauw Y, Wijffels M, & Allessie M. Methods for determining the refractory period and excitable gap during persistent atrial fibrillation in the goat. *Circulation.* 104(8):957–962, 2001.

Efimov IR, Cheng Y, Van Wagoner DR, Mazgalev T, & Tchou PJ. Virtual electrode-induced phase singularity: a basic mechanism of defibrillation failure. *Circ Res.* 82(8):918–925, 1998.

Ekelund LG, Haskell WL, Jonson JL, Whaley FS, Criqui MH, & Sheps DS. Physical fitness as a predictor of cardiovascular mortality in asymptomatic North American men: the lipid research clinic mortality follow-up study. *N Engl J Med.* 319(21):1379–1384, 1988.

Farid T, Nair K, Masse S, Azam MA, Maguy A, Lai PF, Umapathy K, Dorian P, Chauhan V, Varró A, Al-Hesayen A, Waxman M, Nattel S, & Nanthakumar K. Role of KATP channels in the maintenance of ventricular fibrillation in cardiomyopathic human hearts. *Cir Res.* 109(11):1309–1318, 2011.

Fedorov VV, Glukhov AV, Ambrosi CM, KostECKI G, Chang R, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Nichols CG, & Efimov IR. Effects of KATP channel openers diazoxide and pinacidil in coronary-perfused atria and ventricles from failing and non-failing human hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 51(2):215–225, 2011.

Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC, & Nichols CG. Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev.* 90(3):799–829, 2010.

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, & Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 81(6):1072–1082, 1997.

Goldberg MR. Clinical pharmacology of pinacidil, a prototype for drugs that affect potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 12(Suppl2):S41–S47, 1988.

Gonca E & Bozdogan O. Both mitochondrial KATP channel opening and sarcolemmal KATP channel blockage confer protection against ischemia/reperfusion-induced arrhythmia in anesthetized male rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 15(4):403–411, 2010.

Gross GJ & Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res.* 70(2):223–233, 1992.

Gross GJ & Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res.* 84(9):973–979, 1999.

Gross GJ & Peart JN. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285(3):H921–H930, 2003.

Grover GJ & Garlid KD. ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol.* 32(4):677–695, 2000.

Gwathmey JK, Slawsky MT, Perreault CL, Briggs GM, Morgan JP, & Wei JY. Effect of exercise conditioning on excitation-contraction coupling in aged rats. *J Appl Physiol.* 69(4):1366–1371, 1990.

Hajnal A, Nagy O, Litvai A, Papp J, Parratt JR, & Végh A. Nitric oxide involvement in the delayed antiarrhythmic effect of treadmill exercise in dogs. *Life Sci.* 77(16):1960–1971, 2005.

Hamer M & Stamatakis E. Physical activity and cardiovascular disease: directions for future research. *The Open Sports Sciences Journal.* 1:1–2, 2008.

Han J & Moe GK. Nonuniform recovery of excitability in ventricular muscle. *Cir Res.* 14:44–60, 1964.

Harris MB & Starnes JW. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280(5):H2271–H2280, 2001.

Hertzeanu HL, Shemesh J, Aron LA, Aron AL, Peleg E, Rosenthal T, Motro M, & Kellermann JJ. Ventricular arrhythmias in rehabilitated and nonrehabilitated postmyocardial infarction patients with left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol.* 71(1):24–27, 1993.

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, & Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 90(1):291–366, 2010.

Hillsley RE, Wharton JM, Cates AW, Wolf PD, & Ideker RE. Why do some patients have high defibrillation thresholds at defibrillation implantation? *Pacing Clin Electrophysiol.* 17(2):222–239, 1994.

Himmel H, Wettwer E, Li Q, & Ravens U. Four different components contribute to outward current in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 277(1):H107–H118, 1999.

Huizar JF, Gonzalez LA, Alderman J, & Smith HS. Sulfonylureas attenuate electrocardiographic ST-segment elevation during an acute myocardial infarction in diabetics. *J Am Coll Cardiol.* 42(6):1017–1021, 2003.

Huizar JF, Warren MD, Shvedko AG, Kalifa J, Moreno J, Mironov S, Jalife J, & Zaitsev AV. Three distinct phases of VF during global ischemia in the isolated blood-perfused pig heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(3):H1617–H1628, 2007.

Inoue I, Nagase H, Kishi K, & Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.* 352(6332):244–247, 1991.

Iskit AB, Erkent U, Ertunc M, Guc MO, Ilhan M, & Onur R. Glibenclamide attenuates the antiarrhythmic effect of endotoxin with a mechanism not involving K(ATP) channels. *Vascul Pharmacol.* 46(2):129–136, 2007.

Jalife J. Ventricular fibrillation: mechanisms of initiation and maintenance. *Annu Rev Physiol.* 62:25–50, 2000.

Jalife J, Delmar M, Anumonwo J, Berenfeld O, & Kalifa J. *Basic Cardiac Electrophysiology for the Clinician*, Second Edition. Wiley-Blackwell. Oxford, 2009.

Janse MJ, van der Steen AB, & van Dam RT. Refractory period of the dog's ventricular myocardium following sudden changes in frequency. *Circ Res.* 24(2):251–262, 1969.

Janse MJ. The effects of changes of heart rate on the refractory period of the heart (PhD thesis). University of Amsterdam, 1971.

Jennings RB, Sommers HM, Smyth CA, Flack HA, & Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 70:68–78, 1960.

Jennings RB, Sommers HM, Herdson PB, & Kaltenbach JP. Ischemic injury of myocardium. *Ann NY Acad Sci.* 156:61–78, 1969.

Jennings RB & Reiner KA. Patobiología de la isquemia miocárdica aguda. *Hospital Practice (Ed. Español).* 4(7):41–57, 1989.

Jew KN, Charlotte M, Mokolke A, Palmer M, & Moore L. Endurance training alters outward k⁺ current characteristics in rat cardiocytes. *J Appl Physiol.* 90(4):1327–1333, 2001.

Jew KN & Moore RL. Glibenclamide improves postischemic recovery of myocardial contractile function in trained and sedentary rats. *J Appl Physiol.* 91(4):1545–1554, 2001.

Jew KN & Moore RL. Exercise training alters an anoxia-induced, glibenclamide-sensitive current in rat ventricular cardiocytes. *J Appl Physiol.* 92(4):1473–1479, 2002.

Joyeux M, Godin-Ribuot D, & Ribuot C. Resistance to myocardial infarction induced by heat stress and the effect of ATP-sensitive potassium channel blockade in the rat isolated heart. *Br J Pharmacol.* 123(6):1085–1088, 1998.

Kane GC, Liu XK, Yamada S, Olson TM, & Terzic A. Cardiac KATP channels in health and disease. *J Mol Cell Cardiol.* 38(6):937–943, 2005.

Kléber AG & Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev.* 84(2):431–488, 2004.

Kloner RA, Ganote CE, Whalen D, & Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells, II: fine structure during the first few minutes of reflow. *Am J Pathol.* 74(3):399–422, 1974.

Kondo T, Kubota I, Tachibana H, Yamaki M, & Tomoike H. Glibenclamide attenuates peaked T wave in early phase of myocardial ischemia. *Cardiovasc. Res.* 31(5):683–687, 1996.

Konings KT, Kirchhof CJ, Smeets JR, Wellens HJ, Penn OC, & Allessie MA. High-density mapping of electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation.* 89(4):1665–1680, 1994.

Kubota I, Yamaki M, Shibata T, Ikeno E, Hosoya Y, & Tomoike H. Role of ATPsensitive K⁺ channel on ECG ST segment elevation during a bout of myocardial ischemia. A study on epicardial mapping in dogs. *Circulation*. 88(4 Pt 1):1845–1851, 1993.

Lederer WJ, Nichols CG, & Smith GL. The mechanism of early contractile failure of isolated rat ventricular myocytes subjected to complete metabolic inhibition. *J. Physiol*. 413:329–349, 1989.

Li GR & Dong MQ. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Adv Pharmacol*. 59:93–134, 2010.

Li RA, Leppo M, Miki T, Seino S, & Marban E. Molecular basis of electrocardiographic ST-segment elevation. *Circ Res*. 87(10):837–839, 2000.

López L. Efectos del ejercicio físico crónico sobre la excitabilidad intrínseca miocárdica. Estudio experimental. Tesis doctoral. Universitat de València, 2008.

Mace LC, Palmer BM, Brown DA, Jew KN, Lynch JM, Glunt JM, Parsons TA, Cheung JY, & Moore RL. Influence of age and run training on cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange. *J Appl Physiol*. 95(5):1994–2003, 2003.

Maharaj T, Blake R, Trayanova N, Gavaghan D, & Rodriguez B. The role of transmural ventricular heterogeneities in cardiac vulnerability to electric shocks. *Prog Biophys Mol Biol*. 96(1-3):321–338, 2008.

Marcil M, Bourduas K, Ascah A, & Burelle Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca^{2+} -induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290(4):H1549–H1557, 2006.

Martin G, Cosin J, Such M, Hernandez A, & Llamas P. Relation between power spectrum time course during ventricular fibrillation and electromechanical dissociation. Effects of coronary perfusion and nifedipine. *Eur Heart J*. 7(7):560–69, 1986.

Massé S, Farid T, Dorian P, Umapathy K, Krishnakumar Nair K, Asta J, Ross H, Rao V, Sevaptsidis E, & Nanthakumar K. Effect of global ischemia and reperfusion during ventricular fibrillation in myopathic human hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297(6):H1984–H1991, 2009.

McPherson CD, Pierce GN, & Cole WC. Ischemic cardioprotection by ATP-sensitive K^+ channels involves high-energy phosphate preservation. *Am J Physiol Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 265(5):H1809–1818, 1993.

Mokelke EA, Palmer BM, Cheung JY, & Moore RL. Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 273(3):H1193–H1197, 1997.

Natali AJ, Wilson LA, Peckham M, Turner DL, Harrison SM, & White E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 541(Pt 3):863–875, 2002.

Neumar RW, Brown CG, Robitaille PM, & Altschuld RA. Myocardial high energy phosphate metabolism during ventricular fibrillation with total circulatory arrest. *Resuscitation.* 19(3):199–226, 1990.

Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature.* 305(5930):147–148, 1983.

Opie LH. The heart: Physiology, from Cell to Circulation. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 2004.

Orts L. Efectos del ejercicio físico crónico sobre la refractariedad miocárdica ventricular, la velocidad de conducción y el patrón fibrilatorio ventricular intrínsecos, tras la oclusión arterial coronaria aguda: un estudio experimental. Tesis doctoral. Universitat de València, 2007.

Oudit GY & Backx PH. Voltage-Regulated Potassium Channels. In Zipes DP and Jalife J. Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside. Fifth Edition. Saunders Elsevier. Philadelphia, 2009.

Paffenbarger RS & Hale WE. Work activity and coronary heart mortality. *N Engl J Med.* 292(11):545–550, 1975.

Palmer BM, Lynch JM, Snyder SM, & Moore RL. Effects of chronic run training on Na⁺-dependent Ca²⁺ efflux from rat left ventricular myocytes. *J Appl Physiol.* 86(2):584–591, 1999.

Parra G, Díaz B, Such-Miquel L, Cebriá MA, Pelechano F, Trapero I, Zarzoso M, Chorro FJ, Such L, & Alberola AM. Effects of chronic physical exercise on myocardial heterogeneity and its modifications by acute ischemia. *Acta Physiologica.* 195(Suppl667):4, 2009.

Parra G, Zarzoso M, Such-Miquel L, Brines L, Alberola A, Rams C, Such L, & Chorro FJ. El ejercicio físico crónico aumenta la longitud de onda del proceso de activación ventricular en el miocardio isquémico. Estudio experimental. *Rev Esp Cardiol.* 63(3):194, 2010.

Parra G. Estudio de los efectos del entrenamiento físico sobre algunas propiedades electrofisiológicas miocárdicas ventriculares mediante el análisis de la fibrilación ventricular inducida. Una investigación en corazón aislado de conejo. Tesis doctoral. Universitat de València, 2011.

Parra G, Barber J, Such-Miquel L, Diaz B, Salvador R, Pelechano F, Trapero I, Alberola A, Such L, & Chorro FJ. Effect of chronic physical exercise on the electrophysiological inhomogeneity of ventricular myocardium. Experimental study. *Acta Physiologica* 206(Suppl693):196, 2012.

Pelechano F, Such-Miquel L, Such L, López L, Salvador RE, Chorro FJ, Trapero I, Cebriá A, Gómez P, & Alberola A. El entrenamiento disminuye la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio ventricular. Estudio experimental en corazón aislado de conejo. *Archivos de Medicina del Deporte*. 24(5):366, 2007.

Pelechano F. Efectes electrofisiològics miocàrdics intrínsecs sobre l'automatisme, la conducció i la refractarietat produïts per la realització d'un protocol d'entrenament. Estudi experimental. Tesis doctoral. Universitat de València, 2008.

Picard S, Rouet R, Duval D, Chesnay F, & Gérard JL. KATP channel modulators and myocardial damages induced by ischemia-reperfusion: membrane lipids injury and arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol*. 30(12):2613–2621, 1998.

Powers SK, Quindry JC, & Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 44(2):193–201, 2008.

Powers SK, Sollanek KJ, Wiggs MP, Demirel HA, & Smuder AJ. Exercise-induced improvements in myocardial antioxidant capacity: the antioxidant players and cardioprotection. *Free Radic Res*. 48(1):43–51, 2014a.

Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, & Quindry JC. Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology*. 29(1):27–38, 2014b.

Quast U, Stephan D, Bieger S, & Russ U. The impact of ATP-Sensitive K⁺ channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium. *Diabetes*. 53(Suppl3):S156–S164, 2004.

Quindry JC, Schreiber L, Hosick P, Wrieden J, Irwin JM, & Hoyt E. Mitochondrial KATP channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 299(1):H175–H183, 2010.

Quindry JC, Miller L, McGinnis G, Kliszczewicz B, Irwin JM, Landram M, Urbiztondo Z, Nanayakkara G, & Amin R. Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis. *J Appl Physiol*. 113(3):498–506, 2012.

Ramires PR & Ji LL. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281(2):H679–H688, 2001.

Rees SA & Curtis MJ. Pharmacological analysis in rat of the role of the ATP-sensitive potassium channel as a potential target for antifibrillatory intervention in acute myocardial ischaemia. *J Cardiovasc Pharmacol*. 26(2):280–288, 1995.

Reimer KA, Jennings RB, & Hill ML. Total ischemia in dog hearts, in vitro 2. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation, and sarcolemmal integrity. *Circ Res*. 49(4):901–911, 1981.

Riascos D, Baltaxe E, & Pascual G. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido. *Universitas Médica*. 45(3):111–117, 2004.

Scheuer J & Tipton CM. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol*. 39:221–251, 1977.

Shi X, Stevens GHJ, Foresman BH, Stern SA, & Raven PB. Autonomic nervous system control of the heart: endurance exercise training. *Med Sci Sports Exerc*. 27(10):1406–1413, 1995.

Spruce AE, Standen NB, & Stanfield PR. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature*. 316(6030):736–738, 1985.

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, & Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science*. 245(4914):177–180, 1989.

Stewart AJ, Allen JD, & Adgey AJ. Frequency analysis of ventricular fibrillation and resuscitation success. *Q J Med*. 85(306):761–769, 1992.

Strohmenger HU, Lindner KH, Lurie KG, Welz A, & Georgieff M. Frequency of ventricular fibrillation as a predictor of defibrillation success during cardiac surgery. *Anesth Analg*. 79(3):761-769, 1994.

Strohmeier HU, Lindner KH, & Brown CG. Analysis of the ventricular fibrillation ECG signal amplitude and frequency parameters as predictors of countershock success in humans. *Chest*. 111(3):584–589, 1997.

Such L, Rodríguez A, Alberola A, López L, Ruiz R, Artal L, Pons I, Pons ML, García C, & Chorro FJ. Intrinsic changes on automatism, conduction, and refractoriness by exercise in isolated rabbit heart. *J Appl Physiol*. 92(1):225–229, 2002.

Such L, Alberola A, Orts L, Such-Miquel L, Pelechano F, Trapero I, Cebria A, & Chorro FJ. Effects of chronic physical exercise on dominant frequency of ventricular fibrillation heterogeneity produced by acute coronary artery occlusion. A study in isolated rabbit heart. *Eur Heart J*. 27(Suppl1):99, 2006.

Such L, Alberola AM, Such-Miquel L, López L, Trapero I, Pelechano F, Gómez-Cabrera MC, Tormos A, Millet J, & Chorro FJ. Effects of chronic exercise on myocardial refractoriness: a study on isolated rabbit heart. *Acta Physiol*. 193(4):331–339, 2008.

Such L, Parra G, Gallego N, Soler C, & Such-Miquel L. Effect of chronic exercise and ATP-sensitive potassium channel blockade on the spectral characteristics evolution of ventricular fibrillation in acute regional ischemia. *Eur Heart J*. 34(Suppl1):1080, 2013.

Such-Miquel L, Trapero I, Pelechano F, López L, Salvador RE, Cebriá A, Díaz B, Chorro FJ, Alberola A, & Such L. Beneficial intrinsic electrophysiological effects of physical training on acute myocardial ischemia. An study in isolated rabbit heart. *Eur Heart J.* 28(Suppl1):523, 2007.

Sutton PM, Taggart P, Opthof T, Coronel R, Trimlett R, Pugsley W, & Kallis P. Repolarisation and refractoriness during early ischaemia in humans. *Heart.* 84(4):365–369, 2000.

Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marban E, & Nakaya H. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest.* 109(4):509–516, 2002.

Tamayo L. Blockage of potassium channels in septic shock, another lost hope? *Med Intensiva.* 31(5):251–257, 2007.

Tibbits GF, Barnard RJ, Baldwin KM, Cugalj N, & Roberts NK. Influence of exercise on excitation-contraction coupling in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 240(4):H472–H480, 1981.

Tokube K, Kiyosue T, & Arita M. Effects of hydroxyl radicals on KATP channels in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 437(1):155–157, 1998.

Tominaga M, Horie M, Sasayama S, & Okada Y. Glibenclamide, an ATP-sensitive K⁺ channel blocker, inhibits cardiac cAMP-activated Cl⁻ conductance. *Circ Res.* 77(2):417–423, 1995.

Tormos A, Chorro FJ, Millet J, Such L, Cánoves J, Mainar L, Trapero I, Such-Miquel L, Guill A, & Alberola A. Analyzing the electrophysiological effects of local epicardial temperature in experimental studies with isolated hearts. *Physiol Meas.* 29(7):711–728, 2008.

Trapero I, Chorro FJ, Such-Miquel L, Cánoves J, Tormos A, Pelechano F, López L, & Such L. Effect of streptomycin on stretch-induced change in myocardial activation during ventricular fibrillation. *Rev Esp Cardiol.* 61(2):201–205, 2008.

Trube G & Hescheler J. Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pfugers Arch.* 401(2):178–184, 1984.

Tweedie D, Henderson C, & Kane K. Glibenclamide, but not class III drugs, prevents ischaemic shortening of the refractory period in guinea-pig hearts. *Eur J Pharmacol.* 240(2-3):251–257, 1993.

Vajda S, Baczkó I, & Leprán I. Selective cardiac plasma-membrane K(ATP) channel inhibition is desfibrillatory and improves survival during acute myocardial ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 577(1-3):115–123, 2007.

Venkatesh N, Lamp ST, & Weiss JN. Sulfonylureas, ATP-sensitive K⁺ channels, and cellular K⁺ loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circ Res.* 69(3):623–637, 1991.

Wannamethee SG & Shaper AG. Physical activity in the prevention of cardiovascular disease: an epidemiological perspective. *Sports Med.* 31(2):101–114, 2001.

Weiss JN, Venkatesh N, Lamp ST. ATP-sensitive K⁺ channels and cellular K⁺ loss in hypoxic and ischaemic mammalian ventricle. *J Physiol.* 447:649–673, 1992.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, & Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 92(7):1954–1968, 1995.

Wilde AA, Escande D, Schumacher CA, Thuringer D, Mestre M, Fiolet JW, & Janse MJ. Potassium accumulation in the globally ischemic mammalian heart: a role for the ATP-sensitive potassium channel. *Circ Res.* 67(4):835–843, 1990.

Wit AL & Janse MJ. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev.* 69(4):1049–1169, 1989.

Wood PD, Stefanick ML, Williams PT, & Haskell WL. The effects on plasma lipoproteins of a prudent weight-reducing diet, with or without exercise, in overweight men and women. *N Engl J Med.* 325(7):461-6, 1991.

Wu TJ, Lin SF, Hsieh YC, Ting CT, & Chen PS. Ventricular fibrillation during no-flow global ischemia in isolated rabbit hearts. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 17(10):1112–1120, 2006.

Yamada M, Ishii M, Hibino H, & Kurachi Y. Mutation in nucleotide-binding domains of sulfonylurea receptor 2 evokes Na-ATP-dependent activation of ATP-sensitive K⁺ channels: implication for dimerization of nucleotide-binding domains to induce channel opening. *Mol Pharmacol.* 66(4):807–816, 2004.

Yamashita N, Baxter GF, & Yellon DM. Exercise directly enhances myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion injury in the rat through a protein kinase C mediated mechanism. *Heart.* 85(3):331–336, 2001.

Yang MK., Lee SH, Seo HW, Yi KY, Yoo SE, Lee BH, Chung HJ, Won HS, Lee, CS, Kwon SH, Choi WS, & Shin HS. KR-31761, a novel K⁺(ATP)-channel opener, exerts cardioprotective effects by opening both mitochondrial K⁺(ATP) and Sarcolemmal K⁺(ATP) channels in rat models of ischemia/reperfusion-induced heart injury. *J Pharmacol Sci.* 109(2):222–232, 2009.

Zaitsev AV, Berenfeld O, Mironov SF, Jalife J, & Pertsov AM. Distribution of excitation frequencies on the epicardial and endocardial surfaces of fibrillating ventricular wall of the sheep heart. *Circ Res*. 86:408–417, 2000.

Zarzoso M, Such-Miquel L, Parra G, Brines-Ferrando L, Such L, Chorro FJ, Guerrero J, Guill A, O'Connor JE, & Alberola A. The training-induced changes on automatism, conduction and myocardial refractoriness are not mediated by parasympathetic postganglionic neurons activity. *Eur J Appl Physiol*. 112(6):2185–2193, 2012.

Zhang H, Flagg TP, & Nichols CG. Cardiac sarcolemmal K(ATP) channels: Latest twists in a questing tale! *J Mol Cell Cardiol*. 48(1):71–75, 2010.

Zhu Z, Burnett CM, Maksymov G, Stepniak E, Sierra A, Subbotina E, Anderson ME, Coetzee WA, Hodgson-Zingman DM, & Zingman LV. Reduction in number of sarcolemmal KATP channels slows cardiac action potential duration shortening under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 415(4):637–641, 2011.

Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Alekseev AE, & Terzic A. Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci*. 99(20):13278–13283, 2002.

Zingman LV, Zhu Z, Sierra A, Stepniak E, Burnett C, Maksymov G, Anderson ME, Coetzee WA, & Hodgson-Zingman DM. Exercise-induced expression of cardiac ATP-sensitive potassium channels promotes action potential shortening and energy conservation. *J Mol Cell Cardiol.* 51(1):72–81, 2011.

Zipes DP. Electrophysiological mechanisms involved in ventricular fibrillation. *Circulation.* 52(Suppl6):120–130, 1975.

Zuanetti G, De Ferrari GM, Priori SG, & Schwartz PJ. Protective effect of vagal stimulation on reperfusion arrhythmias in cats. *Circ Res.* 61(3):429–435, 1987.