

VNIVERSITAT E VALÈNCIA



FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

Departament de Fisiologia

Estudio comparativo de los efectos electrofisiológicos miocárdicos intrínsecos de la apertura del canal K_{ATP} y del ejercicio físico crónico, en situación de normoxia y tras isquemia regional aguda. Estudio experimental.

Tesis doctoral presentada por:

Catia Simone Alves da Silva

Dirigida por:

Dr. D. Luis Such Belenguer

Dra. Dña. Laia Brines Ferrando

Dr. D. Manuel Zarzoso Muñoz

Valencia, 2015

El Dr. D. Luis Such Belenguer, Catedrático de Universidad del Departament de Fisiologia de la Universitat de València-Estudi General, el Dr. D. Manuel Zarzoso Muñoz, Profesor Ayudante Doctor del Departament de Fisioteràpia de la Universitat de València-Estudi General y la Dra. Dña. Laia Brines Ferrando, investigadora contratada del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

CERTIFICAN: Que el trabajo experimental que lleva por título **“Estudio comparativo de los efectos electrofisiológicos miocárdicos intrínsecos de la apertura del canal K_{ATP} y del ejercicio físico crónico, en situación de normoxia y tras isquemia regional aguda. Estudio experimental.”**, presentado por Catia Simone Alves da Silva 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, octubre de 2015.

Dr. D. Luis Such Belenguer Dr. Dña. Laia Brines Ferrando Dr. D. Manuel Zarzoso Muñoz

La presente tesis doctoral ha podido ser realizada con la ayuda 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 del antiguo Ministerio de Ciencia e Innovación, vigente hasta el 28 de febrero de 2014.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar meus mais profundos e sinceros agradecimentos aos meus pais, Antonia Alves e Francisco Ramos, que durante toda minha vida de estudante, trabalharam duro para que eu pudesse chegar até aqui, sempre ressaltando a importância do querer saber e o valor que tem a educação para um futuro melhor. Aos meus irmãos Adriana Alves e Wagner Alves, pelo apoio, ainda que de longe, e porque sei que posso contar com eles sempre que precisar.

Agradeço de coração ao professor Luís Such Belenguer, por abrir as portas e acolher-me quando já pensava em desistir de um sonho que tanto me custou alcançar.

Agradeço aos professores Luis Such (jr), Manuel Zarzoso, Antonio Alberola e Javier Chorro, pelo apoio e por serem um modelo a seguir.

Agradeço a toda equipe de investigação do laboratório de eletrofisiologia cardíaca, que cada dia me fizeram sentir como em casa, ajudando-me sempre no que precisava. Agradeço a Laia, Irene, Carlos, German, Laura, Oscar, Nathalia, Mariano e outros que contibuíram, de forma direta ou indireta, neste largo camino.

Agradeço aos meus professores do curso de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), especialmente aos professores Francisco Martins da Silva e Maria do Socorro Cirilo por abrir-me as portas do “mundo” da pesquisa e investigação científica.

Agradeço aos meus amigos do Brasil, Daniele, Diana, Michele, Hellyayne, Mucio, Anne e outros que não foram citados, mas sabem o quanto são importantes para mim.

Agradeço também minha família e meus amigos valencianos que me ajudaram a suportar a distância e a ausência dos meus familiares e amigos do Brasil.

Agradeço a ti “cariño”, meu alicerce, meu companheiro, que sempre estava presente, ajudando-me a superar meus medos e minhas inseguranças, corrigindo meus erros de castellano, incentivando-me a concluir essa etapa que sem ti não finalizaria.

A ti “mi pequeña flor de Lis” por aguentar minhas ausências e ao futuro bebê. Vocês me dão forças para seguir lutando, estudando e investigando para que um dia possa dar-lhes um futuro digno.

Muito obrigada.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dejar mis más profundos y sinceros agradecimientos a mis padres, Antonia Alves y Francisco Ramos, que a lo largo de mi vida estudiantil, trabajaron duro para que yo pudiera llegar hasta aquí, siempre haciendo hincapié en la importancia de tener ganas del conocimiento y el valor que tiene la educación para un futuro mejor. Agradezco a mis hermanos Adriana Alves y Wagner Alves por el apoyo, aunque desde lejos, y porque sé que puedo contar con ellos cuando lo necesite.

Agradezco de corazón al profesor Luis Such Belenguer, por acogerme cuando ya pensaba en renunciar a un sueño que tanto me costó conseguir.

Agradezco a los profesores Luis Such (jr), Manuel Zarzoso, Antonio Alberola y Javier Chorro, por el apoyo y ser un ejemplo a seguir.

Agradezco a todo el equipo de investigación del laboratorio de electrofisiología cardíaca, que cada día me hicieron sentir como en casa, ayudándome siempre que necesitaba. Agradezco a Laia, Irene, Carlos, Luis, Manolo, German, Laura, Oscar, Nathalia, Mariano y otros que han contribuido, directa o indirectamente, en este largo camino.

Agradezco a mis profesores del curso de Educación Física de la Universidade Federal da Paraíba (UFPB), especialmente a los profesores Francisco Martins da Silva y Maria do Socorro Cirilo por abrirme las puertas del “mundo” de la investigación científica.

Agradezco a mis amigos de Brasil, Daniele, Diana, Michele, Hellayne, Mucio, Anne y otros que aunque no los mencionen, saben lo importante que son para mí.

Agradezco también a mi familia y mis amigos valencianos que me ayudaron a soportar la distancia y la ausencia de mi familia y mis amigos en Brasil.

Agradezco a ti cariño, mi pilar, mi compañero, que siempre estaba presente, ayudándome a superar mis miedos y mis inseguridades, corrigiendo mis errores de castellano, animándome a completar esta etapa que, sin ti, no finalizaría.

A ti "mi pequeña flor de Lis" por aguantar mis ausencias y al futuro bebé. Me dais fuerzas para seguir luchando, estudiando e investigando para que un día os pueda dar un futuro digno.

Muchas gracias.

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

FD: frecuencia dominante

FD_M: frecuencia dominante media

FV: fibrilación ventricular

I_{CaL}: corriente lenta de entrada de calcio

I_K: corrientes repolarizantes de potasio

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

I_{KACH}: corriente de potasio activada por acetilcolina

I_{KATP}: corriente del canal de potasio ATP dependiente

I_{Na}: corriente de entrada rápida de sodio

I_{to}: corriente transitoria de salida de potasio

IR: índice de regularidad

K_{ATP}: canal de potasio ATP dependiente

KCO: abridores de los canales de potasio

K_{ir}: canal de potasio de rectificación interna

K_{ur}: canal rectificador retardado ultra-rápido de potasio

mitoK_{ATP}: canal de potasio ATP dependiente mitocondrial

μM: micromolar

mM: milimolar

MnSOD: superóxido dismutasa de manganeso

ms: milisegundo

NBD: dominio de unión de nucleótidos

NCX: Intercambiador Na⁺/Ca²⁺

OAC: oclusión arterial coronaria

P5: percentil 5

PCI: preconditionamiento isquémico

PRE: periodo refractario efectivo

PREV: periodo refractario efectivo ventricular

PRFFV: periodo refractario funcional de la fibrilación ventricular

PRFV: periodo refractario funcional ventricular

PA: potencial de acción

sarcK_{ATP}: canal de potasio ATP dependiente sarcolémico

SN: sistema nervioso

SUR: receptor de las sulfonilureas

VV: Intervalos de activación ventricular

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Objetivos.....	7
1.2. Justificación de los objetivos.....	7
1.2.1. Efectos del ejercicio físico crónico: Adaptaciones de los diferentes órganos y sistemas.....	7
1.2.1.1. Generalidades.....	7
1.2.1.2. Análisis de las modificaciones cardíacas, con especial referencia a las modificaciones electrofisiológicas.	13
1.2.2. Efectos biológicos de la isquemia miocárdica.....	20
1.2.2.1. Generalidades.....	20
1.2.2.2. Estudio especial del efecto de la isquemia sobre los parámetros electrofisiológicos en el miocardio ventricular.....	24
1.2.3. Participación de la corriente vehiculada por el canal K_{ATP} en las modificaciones electrofisiológicas por la isquemia aguda.....	27
1.2.3.1. Estructura del canal K_{ATP}	27
1.2.3.2. Regulación de los canales K_{ATP} miocárdicos.	30
1.2.3.3. Consecuencias de la apertura del canal K_{ATP} en la isquemia miocárdica aguda.	33
1.2.4. Revisión sobre el estado actual de conocimientos de los mecanismos por los que el ejercicio físico crónico ejerce un efecto protector cardiovascular.	36
1.2.5. Análisis especial de la implicación del canal K_{ATP} en los efectos protectores del ejercicio físico crónico.....	36
1.3. Resumen de la justificación de los objetivos e hipótesis de trabajo.	43
1.4. Plan de trabajo.....	45
2. MATERIAL Y MÉTODOS	47
2.1. Material.....	49
2.1.1. Animales de experimentación: características.....	49
2.1.2. Reactivos.....	49
2.1.3. Dispositivos.....	50

2.1.3.1. Pesaje de los animales.....	50
2.1.3.2. Entrenamiento de los animales.....	50
2.1.3.3. Infusión del fármaco.....	50
2.1.3.4. Desfibrilación de los corazones aislados.....	51
2.1.4. Sistemas y programas informáticos.	52
2.1.4.1. Sistema de perfusión del corazón.	52
2.1.4.2. Sistema de registro.	54
2.1.4.3. Sistema de estimulación.	55
2.1.4.4. Programas informáticos.	56
2.2. Métodos.	58
2.2.1. Grupos de estudio.	58
2.2.2. Estabulación.	58
2.2.3. Protocolo de entrenamiento físico.	58
2.2.4. Preparación experimental.....	60
2.2.5. Protocolo experimental.....	63
2.2.6. Definición y determinación de los parámetros electrofisiológicos estudiados.....	66
2.2.6.1. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la refractoriedad miocárdica:.....	66
2.2.6.2. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la heterogeneidad electrofisiológica de la FV:.....	68
2.2.6.3. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la frecuencia de activación de la FV:.....	69
2.2.6.4. Parámetros utilizados para la valoración de la inducibilidad (arritmogénesis) y la reversión de la fibrilación ventricular:.....	72
2.3. Análisis estadístico.	72
2.4. Legislación.....	72
3. RESULTADOS	75
3.1. Peso de los animales y de los corazones.....	77
3.2. Flujo coronario.	77

3.3. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la refractariedad miocárdica.	78
3.3.1. Periodo refractario efectivo ventricular obtenido utilizando el TEEV.	78
3.3.2. Periodo refractario funcional ventricular obtenido utilizando el TEEV... ..	80
3.3.3. Periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.	81
3.4. Parámetros utilizados para la valoración de la heterogeneidad electrofisiológica de la FV.	83
3.4.1. Coeficiente de variación del PRFFV.	83
3.4.2. Coeficiente de variación de los intervalos VV.	84
3.4.3. Coeficiente de variación de la FD de la FV.	86
3.4.4. Índice de regularidad.	87
3.5. Parámetros utilizados para la valoración de la frecuencia de activación de la FV.	88
3.5.1. Frecuencia dominante media (FDM) de la fibrilación ventricular.	88
3.5.2. Media de los intervalos VV o intervalos de activación ventricular.	90
3.6. Parámetros utilizados para la valoración de la inducibilidad de la fibrilación ventricular (arritmogénesis) y la reversión de la fibrilación ventricular.	91
3.6.1. Inducibilidad de la fibrilación ventricular.	91
3.6.2. Reversión de la FV.	92
3.6.3. Umbral desfibrilatorio.	93
4. DISCUSIÓN	95
4.1. Comentarios sobre la metodología.	97
4.1.1. Sobre el animal de experimentación.	97
4.1.2. Sobre el protocolo de entrenamiento.	100
4.1.3. Sobre el estudio electrofisiológico.	102
4.2. Sobre los resultados.	104
4.2.1. Comentarios generales.	104
4.2.2. Relativos a la refractariedad.	105
4.2.3. Relativos a la heterogeneidad electrofisiológica.	105

4.2.4. Sobre la arritmogénesis y la reversión de la fibrilación ventricular...	116
4.3. Limitaciones del estudio.	118
4.4. Comentarios finales.....	120
5. CONCLUSIONES	123
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Objetivos.

En líneas generales, en el presente estudio se pretende investigar, en el corazón aislado normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda, la posible implicación de la apertura del canal de potasio sensible a ATP, en las modificaciones electrofisiológicas relacionadas con la instauración, mantenimiento y cese de la fibrilación ventricular (principal causa de muerte súbita cardíaca), producidas por la realización de ejercicio físico crónico.

En concreto pretendemos determinar en corazones aislados de conejos normalmente oxigenados y sometidos a isquemia regional aguda, pertenecientes a un grupo control, a un grupo sometido a un protocolo de entrenamiento físico y a un grupo tratado con un abridor del canal de potasio sensible a ATP, la refractariedad, la heterogeneidad electrofisiológica, las características espectrales de la fibrilación ventricular inducida, la inducibilidad y la estabilidad de la arritmia o resistencia de la misma a su reversión tras la aplicación de choques eléctricos, y establecer similitudes o en su caso divergencias, entre el grupo tratado y el entrenado. Todo ello con el fin de implicar o descartar la participación de la apertura del mencionado canal en las modificaciones electrofisiológicas producidas por el entrenamiento y que han sido objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

1.2. Justificación de los objetivos.

1.2.1. Efectos del ejercicio físico crónico: Adaptaciones de los diferentes órganos y sistemas.

1.2.1.1. Generalidades.

Durante el ejercicio físico agudo ocurren un conjunto de respuestas fisiológicas, entre ellas cardiovasculares, respiratorias, endocrinas,

1. Introducción.

metabólicas y de otros órdenes. Las respuestas cardiovasculares y respiratorias, en especial, tienen como objetivo ofrecer a los músculos ejercitados un aporte de oxígeno y nutrientes adecuado, siendo la primera importante también como sistema de eliminación de los productos de desecho metabólico.

En este apartado hablaremos resumidamente de algunas de las principales adaptaciones generales producidas por el ejercicio físico crónico, que se manifestarán por modificaciones, no solamente en estado de reposo sino también durante el ejercicio agudo.

Entre las adaptaciones respiratorias, podemos destacar el aumento del consumo máximo de oxígeno durante el ejercicio y el aumento del volumen minuto a expensas del volumen corriente. La frecuencia ventilatoria mantiene una relación lineal directa con la ventilación pulmonar, pero los deportistas respiran menos veces para conseguir la misma ventilación por minuto (Selkurt, 1984). Asimismo, los volúmenes pulmonares operativos sufren modificaciones durante el ejercicio. Cuando se aumenta la intensidad del ejercicio, el volumen pulmonar aumenta al final de la inspiración y disminuye al final de la espiración. Esto hace que el diafragma se contraiga desde un estado de pre-elongación mayor, fenómeno que permite a los sujetos sanos aumentar la ventilación durante el ejercicio, más de 20 veces el valor de reposo, sin experimentar una significativa exigencia respiratoria (Guenette y cols., 2007). Cabe destacar también, el aumento de la capacidad de difusión de los gases en el sector alvéolo-capilar, lo que parece estar relacionado más bien con una superficie alvéolo-capilar más extensa y, a su vez, una mayor capacidad de difusión (Bouchard, 1992).

De entre los cambios bioquímicos destacamos el menor uso del glucógeno y la menor acumulación de lactato muscular y sanguíneo en ejercicios submáximos, lo que supone un aumento del umbral anaeróbico; el aumento de la reserva de los sustratos anaerobios e incremento del dispositivo enzimático que opera sobre ellos (Houston, 1977). En corazones de roedores entrenados físicamente se ha demostrado que aumentan las reservas de glucógeno en reposo. Estos altos niveles cardíacos de glucógeno pueden conferir una mayor reserva de sustrato para la actividad cardíaca durante el esfuerzo y ser una buena fuente de sustrato metabólico-energético durante circunstancias como la isquemia aguda (para revisión ver Powers y cols., 2008). En un estudio realizado con perros entrenados, se observó un aumento en la actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en ambos ventrículos, así como un aumento en la actividad de la piruvato quinasa, CS y 3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa en el ventrículo izquierdo, lo que indica que la práctica de ejercicio aeróbico aumenta la capacidad metabólica del miocardio canino aumentando selectivamente las concentraciones de enzimas reguladoras de la glicólisis y del metabolismo oxidativo (Stuewe, 2000).

También cabe destacar el aumento del tamaño y de la cantidad de mitocondrias, así como, cambios cualitativos en las propiedades intrínsecas de éstas (Tonkonogi y Sahlin, 2002); Lee y cols. (2012) en un estudio experimental realizado *ex vivo* sugieren que el ejercicio altera el fenotipo mitocondrial de una manera que contribuye a la cardioprotección. Asimismo, destacamos entre los cambios bioquímicos, el incremento en las concentraciones de fosfágenos y ATP, y de la mioglobina (Pattengale y Holloszy, 1967); la mayor facilidad para la movilización y uso de ácidos grasos, así como el aumento de la capacidad

1. Introducción.

para hacer glucólisis aerobia; y por fin la reducción de la grasa corporal y aumento de la masa proteica muscular, con pérdida de peso (Zuti y Golding, 1976).

En lo concerniente a los cambios en el sistema endocrino cabe mencionar que las modificaciones en dicho sistema por el entrenamiento se producen cuando el entrenamiento ha sido de larga duración (años), y que dichos cambios se producen en la sensibilidad a las diferentes hormonas por parte de las células sobre las que actúan, como consecuencia del entrenamiento (Åstrand y cols., 2003) como es el caso de la insulina y sus receptores en tejido adiposo y muscular (James y cols., 1985). Luciano y cols. (2002) en un estudio realizado con ratas, relataron una mejoría en la sensibilidad a la insulina, debido al ejercicio físico crónico, a través del aumento de la fosforilación de los receptores de insulina IRS-1 y IRS-2, y la asociación de esas proteínas con la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-cinasa). Respecto a la hormona del crecimiento, parece ser que un año de entrenamiento amplifica la liberación pulsátil de GH en reposo, a diferencia del entrenamiento de resistencia de corta duración, que no es acompañado por incrementos de dicha hormona (Eliakim y cols., 1988); y en lo que se refiere al sistema hormonal de las mujeres, el entrenamiento físico, practicado de forma habitual y con fines deportivos, produce efectos transitorios sobre la capacidad de reproducción femenina, con casos de oligomenorrea, amenorrea y retraso en la menarquia en atletas entrenadas y habituadas al entrenamiento físico (González, 1992).

No menos importantes son los cambios que afectan a la fisiología del sistema nervioso, como la disminución del tono simpático con niveles sanguíneos y/o urinarios de catecolaminas más bajos en reposo (Bowers

y cols., 1995); el aumento de la sensibilidad a las catecolaminas en sujetos entrenados, que puede ser debido a un incremento del estado inotrópico (Molé, 1978 citado por Schaible y Scheuer, 1985). Clásicamente ha sido atribuido al ejercicio físico regular un incremento del tono parasimpático (Scheuer y Tipton, 1977), varios estudios han confirmado un mayor control vagal y un menor control simpático cardíaco atribuido al entrenamiento (Dixon y cols., 1992 citado por Yamamoto y cols., 2001; Billman y Kukielka, 2006). Nuestro grupo de investigación ha publicado que la realización de ejercicio físico crónico produce un incremento de la refractariedad ventricular, independiente de la actividad de las neuronas parasimpáticas postganglionares (Zarzoso y cols., 2012; Brines, 2014).

También a nivel cardiovascular, la realización de ejercicio físico crónico produce modificaciones, tanto morfológicas como funcionales. A nivel cardíaco destacan las modificaciones en la masa miocárdica, en la función mecánica y en las propiedades electrofisiológicas de automatismo, conducción, refractariedad, heterogeneidad y estabilidad eléctrica. Respecto a las modificaciones de tipo vascular cabe hacer las siguientes consideraciones. El ejercicio físico crónico puede producir, en el corazón normal, adaptaciones estructurales en la circulación coronaria, incluyendo 1) aumento en el diámetro de las arterias, 2) aumento en la densidad y diámetro de las arteriolas, y 3) mantenimiento de la densidad numérica en la capilaridad coronaria acorde con el grado de hipertrofia cardíaca (Laughlin y cols., 2012).

1. Introducción.



Figura 1.1. Representación de los efectos del ejercicio físico. Tomado y modificado de Sharma y cols. (2015).

A parte de los efectos comentados anteriormente, el ejercicio físico reduce el riesgo de padecer cáncer de próstata y de mama, previene la osteoporosis y puede retardar la aparición de la demencia. Además, también mejora el vigor, promueve la confianza en sí mismo, y es considerado por muchos un potente antidepresivo (Figura 1.1). En cuanto a la longevidad, las personas que practican ejercicio regularmente viven, de media, tres años más que sus homólogos sedentarios, por lo tanto, el ejercicio puede ser considerado el tratamiento más eficaz, accesible y barato que un médico puede recetar (Sharma y cols. 2015).

En relación a las modificaciones sobre el corazón haremos mención aparte y detallada haciendo referencia muy especial a las modificaciones de carácter electrofisiológico antes mencionadas y que resaltaremos en el apartado que sigue.

1.2.1.2. Análisis de las modificaciones cardíacas, con especial referencia a las modificaciones electrofisiológicas.

La práctica regular de ejercicio físico de resistencia produce cambios en varios parámetros cardiovasculares en reposo, siendo especialmente significativos los cambios sobre el automatismo, la conducción auriculoventricular (AV) y la refractariedad.

Una característica clásicamente descrita del efecto del entrenamiento aeróbico sobre las adaptaciones cardiovasculares es la disminución de la frecuencia cardíaca en reposo y durante ejercicios submáximos a valores francamente inferiores a los que exhiben los individuos sedentarios (Blumenthal y cols., 1990). Stein y cols. (2002) realizaron una investigación acerca de las adaptaciones electrofisiológicas intrínsecas del nodo sinusal en atletas de resistencia bien entrenados a los que se les bloqueó los receptores tanto β -adrenérgicos, como colinérgicos, esto es, se les practicó una denervación autónoma farmacológica. Los atletas presentaron unos parámetros de cronotropismo o automatismo sinusal (longitud del ciclo sinusal y tiempo de recuperación del nodo sinusal) más largos que los sujetos control. Las investigaciones realizadas hasta la actualidad no solamente han confirmado la depresión del automatismo sinusal, sino además que dicho efecto se debe a modificaciones de la actividad del sistema nervioso autónomo, y también a factores intrínsecos. Nuestro grupo de investigación encontró, en trabajos previos, una depresión del

1. Introducción.

automatismo sinusal en corazón aislado de conejo entrenado, y por tanto no sometido al control nervioso central ni a influencias hormonales (Such y cols., 2002 y 2008; Zarzoso y cols., 2012; Brines, 2014).

En relación a la conducción auriculoventricular, se ha manifestado que la coexistencia del bloqueo AV tipo I en atletas, con la disminución de la frecuencia cardíaca, apoya que este bloqueo es inducido por el entrenamiento (Bjørnstad y cols., 1993). El hecho de que la resolución de los bloqueos auriculoventriculares, que aparecen también en atletas (Bjørnstad y cols., 1993), pueda ocurrir durante el ejercicio, permite atribuir la depresión de la conducción AV por el entrenamiento, a un aumento del tono vagal (Northcote y cols., 1989), ya que cuando se realiza el ejercicio, disminuye la acción del parasimpático y aumenta la del simpático.

Stein y cols. (2002), citados previamente, también estudiaron en atletas entrenados los efectos del entrenamiento sobre la conducción AV no mediados por el sistema nervioso autónomo. Estos autores encontraron que tanto la longitud del ciclo de Wenckebach como la longitud del intervalo A-V eran mayores en los atletas que en los sujetos control, evidenciando así que el entrenamiento no solamente deprime la conducción auriculoventricular, sino que en este efecto participan factores miocárdicos intrínsecos. Such y cols. (2002), en corazón aislado de conejo entrenado, observaron que el ejercicio físico crónico produce una depresión de la conducción del nodo auriculoventricular, que se manifestó en una más larga longitud del ciclo de Wenckebach en animales entrenados que en los controles, contribuyendo así a confirmar que en la depresión de la conducción AV participan factores de carácter intrínseco.

Finalmente, en cuanto al efecto del ejercicio físico crónico sobre la refractariedad, la importancia del tono parasimpático en reposo sobre la refractariedad ventricular ha sido planteada desde hace varias décadas (Prytowsky y cols., 1981). Farges y cols. (1977) relataron que la acetilcolina acortó el período refractario de las fibras musculares auriculares, pero no modificó la refractariedad en el tejido miocárdico ventricular, solamente una disminución paralela del período refractario auricular y ventricular se produjo con la administración de isoproterenol. Morady y cols. (1988), en un trabajo realizado en humanos, observaron que la administración de atropina acortaba el período refractario efectivo y funcional ventricular, cuando se había bloqueado el sistema adrenérgico con propranolol, y también tras la administración de diferentes dosis de isoproterenol, siendo mayor el alargamiento de la refractariedad cuanto mayor era la dosis de isoproterenol, con lo que estos autores concluyeron que el tono colinérgico alarga el período refractario ventricular, pero en ausencia de una actividad simpática de fondo, y que este alargamiento puede ser acentuado durante la estimulación β -adrenérgica.

Sobre el hecho de que el ejercicio físico modifique la refractariedad a través de la activación de la inervación parasimpática ventricular conviene hacer unas breves consideraciones; a diferencia de los estudios realizados alrededor de la segunda y tercera década y mediados del siglo XX, de los que parecía desprenderse la ausencia de inervación parasimpática en los ventrículos de los mamíferos, estudios más recientes sugieren la presencia de fibras nerviosas parasimpáticas más allá del nodo auriculoventricular, como refirieron Rardon y Baylei (1983). En una revisión realizada por estos autores hace algo más de dos décadas, se puso de manifiesto que hacía relativamente poco tiempo que

1. Introducción.

se le reconocía al sistema nervioso parasimpático un papel fisiológicamente importante sobre la función ventricular, y que podía también influir significativamente sobre las condiciones fisiopatológicas responsables de la iniciación y/o de la finalización de ciertas arritmias ventriculares. Hamra y McNeil (1997) hallaron en el miocardio ventricular aislado (finas rodajas de subendocardio ventricular) de perros sometidos a ejercicio físico crónico, y sedentarios, que la administración de acetilcolina sola no modificó la duración del potencial de acción al 50% y al 90% de la repolarización, a diferencia del isoproterenol que aceleró la repolarización, lo que fue antagonizado por la administración de acetilcolina. Según estos autores, el ejercicio diario crónico no influye sobre las interacciones adrenérgicas/colinérgicas a nivel celular. Warner y Zipes (1994) relataron una prolongación de la refractariedad ventricular como consecuencia del aumento del tono vagal. Un efecto relacionado con la anterior observación fue descrito por Vanoli y cols. (1991), quienes atribuyeron un aumento en el umbral de fibrilación ventricular como un efecto del tono vagal aumentado.

Respecto al efecto del entrenamiento físico sobre la refractariedad intrínseca, se dispone de poca información. Such y cols., (2002), observaron el efecto de un protocolo de entrenamiento mediante ejercicio físico en conejos, con una intensidad mayor a la usada para la realización de la presente tesis doctoral, y pese a que la refractariedad, tanto del sistema de conducción como la del miocardio ventricular de trabajo, mostró una tendencia a aumentar, los cambios detectados no fueron estadísticamente significativos; solamente el período refractario funcional ventricular fue mayor en los animales entrenados.

Posteriormente, aunque ya se había sugerido de una manera poco concluyente, como acabamos de citar, que los efectos del entrenamiento sobre la refractariedad ventricular estaban asentados sobre modificaciones de carácter intrínseco (Such y cols., 2002), se pudo evidenciar el aumento del período refractario efectivo y funcional ventricular mediante la aplicación del test del extraestímulo, cuando se utilizaban trenes de longitud del ciclo cercanos a la longitud del ciclo sinusal básico (López y cols., 2005b). Incluso usando otros trenes de estimulación, si bien no hubo modificaciones estadísticamente significativas de la refractariedad, sí siguió manifestándose una tendencia al aumento de dicho parámetro.

Estas últimas investigaciones parecen apuntar a que el entrenamiento produce modificaciones de carácter intrínseco de algunos de los parámetros que acabamos de mencionar. Así, el período refractario efectivo auricular aumentó significativamente usando diferentes longitudes de tren base de estimulación. Aunque con algunas longitudes de tren base de estimulación no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, en general, los valores de los períodos refractarios fueron mayores en los animales entrenados que en los controles (López y cols., 2005a). Estos efectos contrastan con los producidos “in vivo” como consecuencia del entrenamiento. Nos referimos al hecho de que el entrenamiento aumenta el tono vagal (Blomqvist y Saltin, 1983), de que la acetilcolina acorta el período refractario efectivo auricular (Farges y cols., 1977) y, por tanto, ello supone un efecto opuesto al observado por nosotros en corazón aislado. Es decir, que por una parte se desarrolla un mecanismo dependiente del corazón sometido a control neurohumoral claramente proarrítmico y, parece ser, que también se desarrolla otro de tipo intrínseco con efecto

1. Introducción.

antiarrítmico. En un estudio realizado por nuestro grupo hemos encontrado que la realización de ejercicio físico crónico produce un incremento de la refractariedad ventricular, apreciada mediante el test del extraestímulo ventricular y durante la fibrilación ventricular; y que este incremento no depende de la actividad de las neuronas postganglionares parasimpáticas (Zarzoso y cols., 2012; Brines, 2014).

Otros autores realizaron una investigación del efecto del entrenamiento sobre la duración del PA en ratas entrenadas en la cual hallaron un aumento de la duración del PA en los cardiomiocitos procedentes del subepicardio de las ratas entrenadas, y no encontraron ninguna modificación sobre la duración del potencial de acción en las células subendocárdicas (Natali y cols., 2002).

No disponemos de información respecto al efecto del entrenamiento sobre la refractariedad auricular intrínseca, aunque por contra, sí se conoce el efecto sobre la refractariedad ligada al control nervioso autónomo. El hecho conocido de que el ejercicio físico aumente el tono vagal, y de que la acetilcolina disminuya el período refractario efectivo auricular (Farges y cols., 1977) nos inclina a otorgar una disminución de la refractariedad por el ejercicio físico en el corazón *in situ*. Contrastan con lo que acabamos de decir respecto al efecto del entrenamiento sobre el período refractario auricular, los resultados obtenidos por Mezzani y cols. (1990) en un estudio realizado a dos grupos de pacientes con Wolf-Parkinson-White. En el grupo de pacientes entrenados se observó un período refractario auricular tanto efectivo como funcional más largo que en los sujetos control. Estos autores también observaron que tanto la longitud del ciclo basal, como el período

refractario efectivo del sistema de conducción anterógrado y ventriculoauricular fueron más largos en los sujetos entrenados.

Estudios realizados en humanos acerca de las adaptaciones electrofisiológicas al ejercicio físico del nodo AV y del nodo sinusal, como se ha mencionado en un apartado anterior, refieren que atletas de resistencia sometidos a bloqueo farmacológico del sistema nervioso autónomo, también presentaron una modificación de la refractariedad intrínseca en el sistema de conducción auriculoventricular respecto a los sujetos control, también sometidos a bloqueo del sistema nervioso autónomo. Efectivamente, el período refractario efectivo del nodo AV era mayor en los atletas en situación basal (Stein y cols., 2002).

Respecto a la duración del potencial de acción, existen diferentes trabajos que han investigado las posibles modificaciones producidas por el entrenamiento sobre determinados procesos electrofisiológicos relacionados con la refractariedad miocárdica. Así, Brorson y cols. (1976), investigando en humanos los efectos del entrenamiento sobre el potencial de acción monofásico y la refractariedad auricular, observaron un aumento de la duración del potencial de acción en el grupo entrenado, atribuyéndolo a un aumento en la concentración intracelular de potasio. Otros autores como Tibbits y cols. (1981), estudiando los efectos del entrenamiento sobre el acoplamiento excitación-contracción, encontraron también un aumento en la duración del potencial de acción en el grupo entrenado, que dichos autores atribuyeron a un aumento en la entrada de calcio. Del mismo modo, Gwathmey y cols. (1990) investigando en ratas el efecto combinado del entrenamiento y del envejecimiento sobre algunos parámetros fisiológicos, observaron un aumento de la duración del potencial de acción en el grupo entrenado, explicado con los mismos mecanismos.

1. Introducción.

Pensamos que quizá el aumento de la refractariedad producido por la realización de ejercicio físico aeróbico sea lo que subyace a la baja incidencia de taquiarritmias en deportistas señalada por diferentes autores (Boraita y Serratosa, 1998), siendo la incidencia de extrasístole, tanto supraventricular como ventricular, inferior a la que se da en la población juvenil en general; aunque en opinión de estos últimos autores el predominio vagal no solamente estaría implicado en la inhibición de los marcapasos fisiológicos sino también de los focos ectópicos. No obstante, estos autores sugieren también un efecto beneficioso del entrenamiento sobre la estabilidad eléctrica tanto de aurículas como de ventrículos para explicar la baja incidencia de taquiarritmias, además de considerar la posible existencia de un proceso de selección natural que impida que los deportistas que las presenten lleguen a la élite por ser excluidos en épocas tempranas de la competición (Boraita y Serratosa, 1999).

1.2.2. Efectos biológicos de la isquemia miocárdica.

1.2.2.1. Generalidades.

El término “isquemia” proviene de la unión de dos palabras griegas: ἵσχειν (*ísjein*) detener y αἷμα (*aíma*) sangre y significa literalmente detención de la sangre. Jennings (1970) citado por Carmeliet (1999) la define como una situación de reducción del flujo de sangre arterial con un insuficiente aporte de oxígeno que obliga a la puesta en marcha de un metabolismo anaeróbico. En este sentido, la isquemia se caracteriza por una entrada de energía deficiente con una eliminación de residuos deficiente. El resultado es el fracaso de la contracción, el deterioro del comportamiento eléctrico, y finalmente la muerte de la célula.

Durante un evento isquémico ocurre una serie de alteraciones bioquímicas e iónicas que producen cambios en las propiedades electrofisiológicas de los miocitos, y que son responsables finales de las arritmias que se producen durante la isquemia aguda. En éste apartado matizaremos en primer lugar las alteraciones bioquímicas y seguidamente destacaremos los cambios iónicos ocurridos durante la isquemia.

Respecto a las consecuencias bioquímicas de la isquemia, destacamos la deprivación energética como consecuencia de mayor relevancia, caracterizada por una caída dramática del ATP a los pocos segundos del evento isquémico. Sin embargo, pese a lo anterior, la célula tiene diferentes maneras de mantener los niveles adecuados de ATP, entre las cuales podemos destacar: 1) las demandas de energía caen muy rápidamente durante los primeros 30 segundos de isquemia a consecuencia de un fallo en la contracción, 2) una importante cantidad de fosfocreatina es continuamente usada como vía de reposición de ATP y 3) la producción de energía por la glucólisis anaerobia comienza y se intensifica (para revisión ver Carmeliet, 1999). La glucólisis anaerobia supone la formación de una importante cantidad de ácido láctico, lo que detendrá la continuación de la glucólisis en el interior de la mitocondria. La disminución del pH acabará por limitar e inhibir la propia glucólisis y suprimir por tanto la producción de ATP a cuenta de esta ruta metabólica. La consecuencia de que la energía libre de la hidrólisis del ATP exceda a la energía almacenada en el gradiente electroquímico de protones puede ocasionar una hidrólisis neta de ATP, operando la ATP sintasa como una hidrolasa, utilizándose la energía para reponer el gradiente eléctrico en la mitocondria (para revisión ver Carmeliet, 1999).

1. Introducción.

Otra consecuencia de la falta de ATP es la despolarización de la membrana mitocondrial. Aunque, eso 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 través de la glucólisis. La depleción de ATP lleva a un incremento de la concentración intracelular de calcio. Ese incremento de la concentración de calcio, y otros protones, fosfato y acil-carnitinas de cadena larga, acaba generando la activación del llamado poro de transición o megacanal por el cual la mitocondria llega a ser anormalmente permeable (para revisión ver Carmeliet, 1999).

En lo referente a los cambios iónicos durante la isquemia cabe destacar las modificaciones en las concentraciones de potasio (K^+), sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) que relataremos de manera sucinta a continuación.

La concentración de potasio intracelular en condiciones fisiológicas normales es mayor que la extracelular y este equilibrio dinámico depende de la bomba Na^+/K^+ . Durante la isquemia este equilibrio se pierde y como consecuencia aumenta la concentración extracelular de potasio y ese es, a nivel iónico, uno de los efectos más inmediatos e indiscutibles de la isquemia, hecho claramente arritmogénico (Harris, 1996). En relación a dichos cambios en la concentración de potasio durante la isquemia, se producen normalmente en tres fases: dentro de 20 segundos después de la oclusión de una arteria coronaria hay una acumulación rápida de K^+ en el espacio extracelular que alcanza una meseta después de 3-10 minutos y es seguido por un tercer incremento más lento que comienza entre los 15 y 30 minutos (para revisión ver Carmeliet, 1999).

El incremento en los niveles de potasio extracelular produce un efecto despolarizante, una inactivación de los canales de Na^+ y la despolarización celular, reduciendo la amplitud y la duración del PA. En

este sentido las corrientes de potasio dependientes de ATP son de especial relevancia. Si bien es cierto que la activación de dicho canal en isquemia es importante para la prolongación de la vida celular y preservación funcional, también es cierto que la activación de este canal produce un acortamiento de la refractariedad y del potencial de acción que podría promover la propia FV (para revisión ver Carmeliet, 1999).

Respecto a la concentración de sodio intracelular, ésta aumenta de 10 mM a 20 mM durante la isquemia. Dicho aumento se debe en parte por la disminución de la actividad del sistema de intercambio Na^+/K^+ , inhibida por la disminución de la concentración de ATP y la acumulación de radicales libres intracelulares y por otra parte por efecto de la activación del intercambiador de Na^+/H^+ y de los canales voltaje dependientes de Na^+ . El efecto del incremento de la concentración de Na^+ intracelular es la activación del intercambiador Na^+/H^+ y de los canales de Na^+ y K^+ voltaje dependientes, tras la reperfusión, estos efectos conducen a una hiperpolarización y acortamiento del potencial de acción (para revisión ver Carmeliet, 1999).

En relación a los cambios en la concentración de calcio, estos varían según compartimento celular que consideremos (citosol, mitocondria y retículo sarcoplásmico) y según las fases del ciclo cardíaco. Respecto al calcio citosólico, durante la isquemia se produce un aumento importante, que como citamos anteriormente, varía en función del ciclo cardíaco. En la sístole ventricular se produce un rápido aumento de la concentración a los pocos minutos de iniciarse la isquemia celular y en la diástole no se produce este incremento hasta pasados unos 10-20 minutos. Los cambios producidos en la concentración de calcio en el citosol celular son semejantes a los producidos en la mitocondria. Los mecanismos que explican el aumento del calcio citosólico son varios:

1. Introducción.

disfunción del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que reduce la salida de Ca^{2+} al espacio extracelular; disminución de la entrada de Ca^{2+} al retículo sarcoplasmático; y aumento de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior por acción de intercambiadores como $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. Los cambios producidos en el retículo sarcoplásmico no han sido medidos directamente pero es de suponer que, como consecuencia de la salida masiva y la inhibición de la actividad de la bomba Ca^{2+} -ATPasa, se produzca una disminución de los depósitos de calcio sarcoplásmicos (para revisión ver Carmeliet, 1999). Estos cambios en la concentración de calcio originan la activación de enzimas como las fosfolipasas que producen un cúmulo de sustancias como la lisofosfatidilcolina que, probablemente por su carácter anfifílico, tiene efectos arritmogénicos (Opie, 1984).

1.2.2.2. Estudio especial del efecto de la isquemia sobre los parámetros electrofisiológicos en el miocardio ventricular.

Los cambios electrofisiológicos que ocurren durante la isquemia son consecuencia de cambios en las concentraciones iónicas y cambios producidos por radicales libres, estos últimos secundarios a los cambios iónicos. Así pues, podríamos explicar el efecto de la isquemia sobre los parámetros electrofisiológicos en función del comportamiento iónico. Durante la primera fase de la isquemia se produce un alargamiento de la duración del potencial de acción debido al bloqueo de los canales de salida de potasio, lo que puede generar arritmias secundarias a postpotenciales precoces. Durante la segunda fase, se produce un acortamiento en la duración del potencial de acción debido a la inhibición de las corrientes rápidas de sodio y a la activación de los canales K_{ATP} que generan una hiperpolarización celular. En la última fase de la isquemia, la célula pasa a un estado inexcitable (para revisión ver Carmeliet, 1999).

La oclusión coronaria aguda provoca una liberación inmediata de catecolaminas al torrente sanguíneo, lo que estimula los receptores α y β adrenérgicos presentes en la membrana de los cardiomiocitos. La estimulación de los receptores α produce una modulación de la bomba Na^+/K^+ y de los canales de K^+ que genera un acortamiento de la fase 4 del potencial de acción de las células automáticas y un alargamiento de la repolarización celular y del QT. Dicha estimulación puede inducir arritmias por postpotenciales o por automatismo anormal (Carmeliet, 1999).

A su vez, la estimulación de los receptores β , producen a través de la modulación de diversas corrientes ($I_{\text{Ca-L}}$, corrientes I_f , I_{to} , I_{K}) el incremento de calcio intracelular e hiperpolarización celular (debido a la activación de la bomba Na^+/K^+). La acumulación de Ca^{2+} y K^+ intracelular producen una aceleración de la conducción AV (que puede favorecer la aparición de taquicardias) y un acortamiento del periodo refractario que se traduce en un acortamiento del intervalo QT (para revisión ver Carmeliet, 1999).

Pese a lo anterior, durante la isquemia también hay una liberación de adenosina y acetilcolina por estimulación de reflejos vagales. Esas sustancias estimulan los receptores muscarínicos y purinérgicos (que producen la salida del K^+) y en general, sus efectos son opuestos a los producidos por la estimulación β -adrenérgica. Electrofisiológicamente, la adenosina y acetilcolina causan la hiperpolarización de la célula y el acortamiento del potencial de acción. En resumen, la isquemia coronaria aguda promueve una disminución del potencial de reposo (de -85mV a -60mV), acortamiento de la duración del potencial de acción y una prolongación del periodo refractario efectivo (para revisión ver Carmeliet, 1999).

1. Introducción.

En relación a la caída del potencial de reposo, ésta es debido al efecto despolarizante de la isquemia sobre la membrana celular, causada fundamentalmente por el aumento en la concentración de potasio, lo que eleva el potencial de reposo a valores menos negativos (Kleber, 1983).

El acortamiento de la duración del potencial de acción es fundamentalmente debido a las corrientes de salida de potasio (por la activación de la corriente $I_{K_{ATP}}$) y cloro (por activación de la corriente I_{Cl}). Estos dos canales no se activan en condiciones fisiológicas, sino en condiciones de hipoxia (caso del K_{ATP}) y activación de los receptores adrenérgicos (caso del Cl). En la zona que separa la zona isquémica de la no isquémica, también conocida como zona límite (*border zone – BZ*) el acortamiento de la duración del potencial de acción es debido a una “corriente de lesión”, que es una corriente generada por la diferencia de potencial de reposo entre ambas zonas, isquémica y no isquémica.

En relación al periodo refractario efectivo, pese a la disminución de la duración del potencial de acción, se produce una prolongación de dicho parámetro debido al enlentecimiento en la recuperación de la inactivación de los canales de sodio, y también al bloqueo de los canales de sodio por los metabolitos secundarios al metabolismo anaeróbico. Sin embargo, la modificación en la duración del periodo refractario efectivo no es homogénea sino que varía en según qué zonas, habiendo una heterogeneidad miocárdica. Esta dispersión facilita la instauración de arritmias por reentrada (para revisión ver Carmeliet, 1999).

1.2.3. Participación de la corriente vehiculada por el canal K_{ATP} en las modificaciones electrofisiológicas por la isquemia aguda.

1.2.3.1. Estructura del canal K_{ATP} .

Los canales de potasio sensibles a ATP (canales K_{ATP}) fueron descubiertos por Noma y cols. (1983). Al principio fueron identificados en parches de membrana aisladas preparadas a partir de miocitos ventriculares de cobaya y posteriormente, identificados en otros tejidos incluyendo el cerebro, el músculo esquelético y liso, el epitelio renal y traqueal, el músculo liso del tracto urinario y el páncreas, donde actúan como moduladores de la liberación de insulina por las células pancreáticas beta (Kersten, 1998). Dichos canales están formados de subunidades del receptor de las sulfonilureas (SURx), de una proteína Kir6.x, perteneciente a la superfamilia de los canales de potasio de rectificación interna (Kir) y otros componentes adicionales. Un canal K_{ATP} funcional es un hetero-octámero compuesto por cuatro subunidades Kir6.x y cuatro subunidades SURx (figura 1.2).

La subunidad que regula la actividad de los canales K_{ATP} , denominada SURx, presenta dos subtipos, SUR1 y SUR2, este último, pudiendo presentar dos isoformas, SUR2A y SUR2B. Las subunidades SUR2A y SUR2B difieren sólo en los 42 aminoácidos del extremo carboxilo-terminal (C42) (Hibino y cols., 2010). Las subunidades Kir que forman el poro de los canales K_{ATP} pueden ser de dos tipos: Kir6.1 y Kir6.2, que, en general, tienen la misma estructura de poro, no obstante, presentan distintas conductancias de canal único (~35 y ~80 pS, respectivamente, en soluciones de K^+ 150 mM).

1. Introducción.

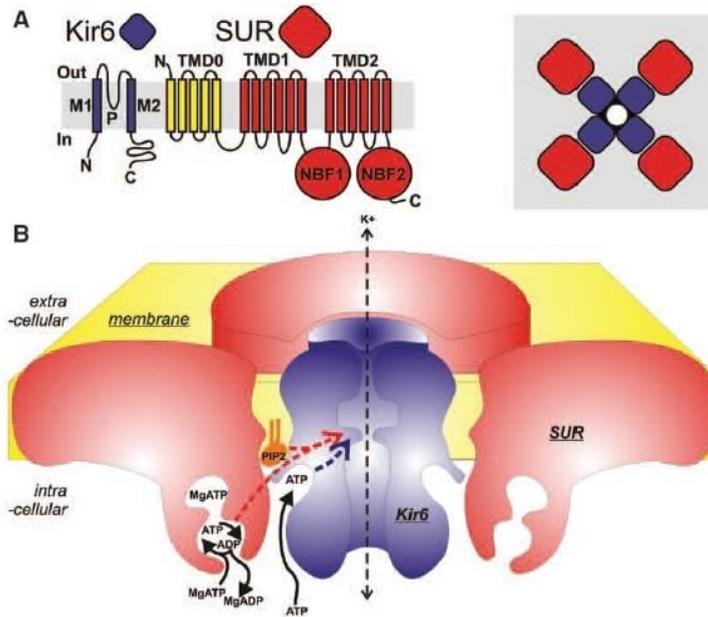


Figura 1.2. Componentes moleculares de los canales K_{ATP} . Tomado de Nichols y cols. (2013).

La combinación de diferentes subunidades SUR y Kir dan lugar a los distintos tipos de canales K_{ATP} en diferentes localizaciones anatómicas (fig 1.3). A nivel de músculo cardíaco, se pueden expresar diferentes variantes de unión de subunidades SUR y Kir, sin embargo, se conoce que los canales K_{ATP} sarcolemales de miocitos ventriculares se componen principalmente de la combinación SUR2A: Kir6.2 (Para revisión ver Flagg y cols., 2010).

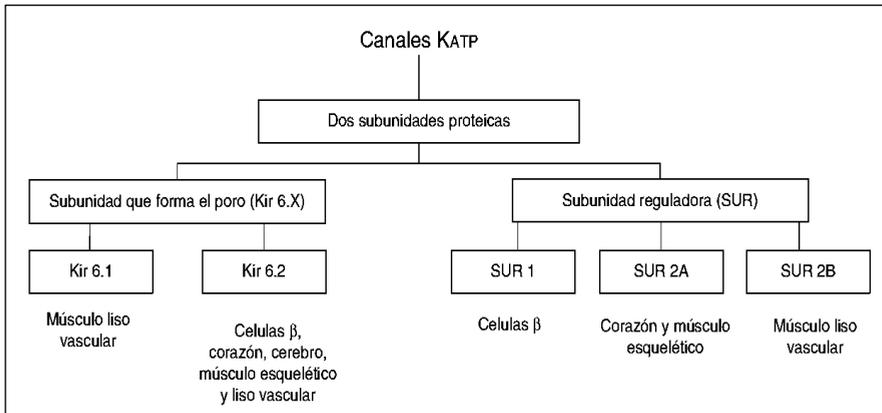


Figura 1.3. Diferentes subunidades que conforman el canal KATP. Tomado de Tamayo (2007).

En 1991 Inoue y cols. describieron por primera vez canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) en mitoplastos gigantes preparados a partir de mitocondrias de hígado de rata. Un año más tarde, Paucke y cols. (1992) en el laboratorio de Keith Garlid, demostró que estos canales tenían características similares a los $\text{SarcK}_{\text{ATP}}$, es decir, están compuestos por cuatro subunidades Kir6.x y cuatro subunidades del receptor de las sulfonilureas SURx. Sin embargo, presentan funciones distintas, mientras la función de los $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ está ligada principalmente con el control del volumen de la matriz mitocondrial, la función de los canales de K_{ATP} sarcolemales está relacionada con la regulación de la actividad eléctrica. En 1997, Garlid y cols. demostraron la relación entre los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ y la cardioprotección. Este grupo de investigadores reportó que la farmacología de los canales de K_{ATP} de la membrana plasmática y la de los canales K_{ATP} mitocondriales era diferente, y que algunos fármacos, como el diazóxido, actuaban en dichos canales de forma distinta (García-Rivas, 2006)

1.2.3.2. Regulación de los canales K_{ATP} miocárdicos.

Los canales K_{ATP} deben su nombre a la regulación inhibitoria conferida por el ATP intracelular, por lo que un descenso en la concentración de este nucleótido favorece la activación de dicho canal. En todas las células los canales K_{ATP} ajustan el estado metabólico celular con la actividad eléctrica de la membrana plasmática. Estos canales además de regular el potencial de reposo también modulan el potencial de acción, y esto puede desempeñar un papel fundamental en los procesos fisiológicos (Tamayo, 2007).

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 bifosfato de magnesio (Mg_{ADP}), funcionando el ATP como un bloqueador del canal, y el Mg_{ADP} como un activador o promotor de su apertura (Li y Dong, 2010). La regulación de dichos canales es bastante compleja y se produce a varios niveles por fosfolípidos de la membrana (PIP_2), ácidos grasos (LC-acil-CoA), protein-quinasas (PKA, PKC), pH, y los nucleótidos intracelulares (ATP, Mg_{ADP}), así como por agentes farmacológicos (para revisión ver Flagg y cols., 2010).

Fisiológicamente, la regulación del canal por los nucleótidos intracelulares (ATP, Mg_{ADP}) es la más importante. En condiciones fisiológicas, el ATP intracelular (ATP_i) es el regulador principal del canal K_{ATP} . Este compuesto de alta energía se une a la subunidad Kir6.2 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, los nucleótidos bifosfato, 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 ATPi. 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 ATPi. No obstante, los efectos positivos del ADP requieren la presencia de Mg^{2+} ; en ausencia de Mg^{2+} aumenta el efecto inhibitorio del ATPi. La acción de los canales K_{ATP} también puede ser regulada por vías de señalización mediadas por las protein-quinasa PKA y PKC, aunque todavía no está claro cómo la fosforilación activa estos canales (Hibino y cols., 2010).

Otro regulador de los canales K_{ATP} es el pH, que hace que dichos canales puedan ser activados, incluso bajo condiciones fisiológicas, con un aumento de la demanda metabólica. La activación simpática aumenta la frecuencia cardíaca y la contractilidad miocárdica, lo que resulta en una mayor demanda de oxígeno. La producción de energía anaeróbica en el corazón con un aumento de la demanda de oxígeno y la estimulación simpática durante la realización de ejercicio físico intenso, acelera la glucólisis y la acumulación de lactato intracelular (Figura 1.4). Ha sido reportado que el lactato intracelular puede activar los canales sarc K_{ATP} en células ventriculares de conejo. Asimismo, en corazones humanos, el acortamiento del potencial de acción durante la realización de ejercicio intenso y estimulación simpática puede ser atribuido a la activación de los K_{ATP} sarcolemales (Nakaya, 2014).

1. Introducción.

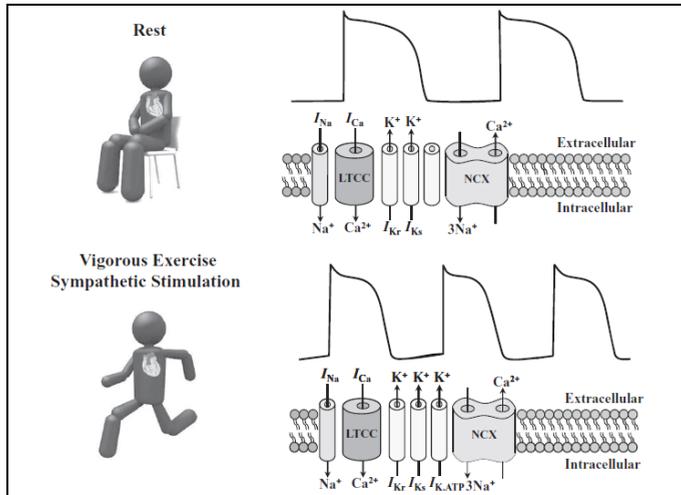


Figura 1.4. Relación entre el canal K_{ATP} y el potencial de acción en situación de reposo y durante ejercicio intenso. Tomada de Nakaya (2014).

Los canales de potasio ATP dependientes pueden ser regulados por una gran variedad de fármacos, que tienen la capacidad de abrirlos o cerrarlos. Entre los fármacos destinados al bloqueo de dichos canales, podemos encontrar la glibenclamida, que es uno de los bloqueadores más conocidos, no específico, que actúa tanto en el sarcolema como en la mitocondria. Por otro lado, el 5-HD puede bloquear selectivamente los canales $mitoK_{ATP}$ y el HMR 1883 o HMR 1098 puede inhibir selectivamente los canales K_{ATP} sarcolemales. En cuanto a la activación de los canales, la mayor parte de los denominados abridores de canales de potasio (KCO – *potassium channel openers*) no son selectivos y actúan uniéndose a la subunidad SUR para modular su activación. Actualmente no existe un abridor selectivo para los K_{ATP} en el sarcolema, sin embargo, el diazóxido puede abrir selectivamente los $mitoK_{ATP}$. El pinacidil, (4-pyridil cianoguanidina), fármaco utilizado en esta tesis, originariamente conocido como Agente P1134 (Ahnfelt-Ronne, 1988

citado por Ferrero, 2005), es un abridor no selectivo de los canales K_{ATP} ampliamente estudiado por sus propiedades cardioprotectoras y comercializado por su efecto antihipertensivo debido a su acción relajante en el músculo liso (Ferrero, 2005).

1.2.3.3. Consecuencias de la apertura del canal K_{ATP} en la isquemia miocárdica aguda.

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 (Vajda y cols., 2007). 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, la falta de uniformidad de la repolarización y en última instancia a la inducción de arritmias malignas. Existe una fuerte evidencia científica de que la acumulación extracelular de potasio inducida por la isquemia y consecuentemente la reducción de la duración del PA es el resultado, en gran medida, de la apertura de canales K_{ATP} (Billman, 1994; y Billman, 2008).

Los efectos protectores de la activación de los canales K_{ATP} durante la isquemia vienen siendo ampliamente debatidos. Gross y cols. (1999) proponen que la apertura de los canales K_{ATP} es responsable de la cardioprotección a través del acortamiento de la fase 3 de repolarización del potencial de acción y la hiperpolarización de la membrana cardíaca, ya que ambos, reducirían la sobrecarga de calcio durante la isquemia o reperfusión y ello conllevaría una preservación del ATP. Asimismo, Garlid citado por Tamargo (2004), propone que la apertura de los

1. Introducción.

canales K_{ATP} durante la isquemia miocárdica acorta el potencial de acción y disminuye la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L, ambos efectos previenen la sobrecarga de Ca^{2+} , preservando los niveles de ATP e incrementando la supervivencia celular.

El efecto protector se debe a que al reducir la entrada de Ca^{2+} , las reservas de energía que de otro modo serían utilizadas por la célula para la contracción, son preservadas. Esta “maniobra” cardioprotectora es autolimitada, ya que si muchos miocitos detienen la contracción, el corazón deja de bombear y el animal muere. Siendo así, 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 y cols., 2010). Asimismo, Lederer y cols. (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 fallo contráctil precoz. Se conoce que la sobrecarga de calcio puede conducir a la muerte celular por necrosis y apoptosis, así pues, la activación de los canales sarc K_{ATP} puede ser un mecanismo cardioprotector al disminuir la entrada de calcio, el grado de contractura de los miofilamentos e impedir la sobrecarga de calcio mitocondrial.

McPherson y cols. (1993), utilizando una sustancia abridora del canal K_{ATP} , el pinacidil, en un modelo de isquemia global en el ventrículo derecho de cobayas, observaron una mejoría en la preservación del ATP y de la energía almacenada en forma de fosfato de creatina, lo que

probablemente se encuentra ligado a su efecto sobre la contractura isquémica y a un fallo prematuro contráctil.

El papel que la apertura de dichos canales juega en el preconditionamiento isquémico (PCI), mecanismo por el cual la exposición del corazón a breves períodos de isquemia que preceden a un episodio isquémico sostenido, conduce a una reducción significativa en el tamaño del infarto, también ha sido ampliamente estudiado, sobre todo en relación a la contribución de los canales K_{ATP} sarcolemales o mitocondriales. Si bien hace tiempo se planteó la hipótesis de que los canales K_{ATP} sarcolemales eran responsables de la protección del miocardio isquémico en el caso del preconditionamiento, evidencias posteriores sugieren que pueden ser los canales K_{ATP} mitocondriales los que medien la cardioprotección inducida por el preconditionamiento (Gross and Fryer, 1999). Siguiendo esta línea, Gross y Auchampach (1992) propusieron por primera vez que la apertura de los canales K_{ATP} estaba involucrada en los efectos protectores del preconditionamiento isquémico y que los fármacos abridores de dicho canal simulaban el preconditionamiento, mientras que los bloqueadores eliminaban la función protectora durante la isquemia. Así mismo, también ha sido documentado que los abridores de los canales K_{ATP} preservan el rendimiento mecánico durante la reperfusión, mientras que sus antagonistas pueden deteriorar la disfunción mecánica bajo estas condiciones (ver revisión de Billman, 1994).

Si por un lado, la activación de dichos canales parece preservar los niveles de ATP durante la isquemia, alargando la supervivencia celular, por otro lado, la acumulación de K^+ extracelular y el acortamiento del periodo refractario, hacen que el corazón isquémico sea más vulnerable a arritmias por reentrada (Janse y Wit, 1989).

1. Introducción.

Billman (1994) en una revisión sobre el tema, describió que bajo ciertas condiciones, la activación de los canales de potasio puede presentar propiedades antiarrítmicas, particularmente contra las arritmias que resultan de anormalidades en la repolarización. En este sentido, diversas propiedades antiarrítmicas fueron atribuidas a los abridores de los mencionados canales en modelos experimentales no-isquémicos, en los cuales las arritmias se producen como resultado de post-despolarizaciones tempranas, que son oscilaciones de potencial de membrana que ocurren durante la fase 3 del potencial de acción cardíaco, que dependen fundamentalmente, de un retraso en la repolarización y pueden ser prevenidas por un activador de los canales K_{ATP} (ver revisión de Billman, 1994).

1.2.4. Revisión sobre el estado actual de conocimientos de los mecanismos por los que el ejercicio físico crónico ejerce un efecto protector cardiovascular.

Como es sabido una de las principales causas de muerte en el mundo occidental industrializado es la muerte súbita de origen cardíaco, producida fundamentalmente por la instauración de fibrilación ventricular (FV), que se caracteriza por la presencia de una actividad eléctrica desorganizada y caótica y que en un plazo de 4 a 5 segundos después del comienzo de la FV se produce alteraciones de la función cerebral por ausencia de flujo sanguíneo efectivo, provocando la muerte si la FV no es revertida (Guyton y Hall, 2006).

El ejercicio físico crónico ha sido propuesto como maniobra protectora no farmacológica antiarrítmica (Billman, 2002). Estudios de carácter experimental y clínico han evidenciado el efecto protector de la práctica de ejercicio físico regular frente a la instauración de ciertas

arritmias. Así, en un estudio realizado por Hull y cols. (1994) se observó una mayor dificultad para producir FV inducida por la isquemia en perros que habían seguido protocolos de ejercicio físico, contrariamente a lo que sucedía con los animales sedentarios. De la misma forma, Collins y Dicarlo (2005), investigando el efecto del ejercicio físico agudo sobre el umbral para la instauración de arritmias ventriculares y el papel que podía jugar el sistema receptor de adenosina intrínseco, encontraron que la realización de ejercicio elevó el umbral de aparición de ciertas arritmias. Lujan y cols. (2006) en un estudio realizado con ratas corredoras con alta capacidad aeróbica, en el que se investigó la susceptibilidad a las arritmias producidas tras un tiempo breve de OAC seguida de reperfusión, encontraron una menor incidencia de taquiarritmias ventriculares en las ratas con mejor capacidad aeróbica.

Pese a las observaciones realizadas anteriormente, los mecanismos básicos que están implicados en los efectos beneficiosos citados no se hallan totalmente dilucidados en la actualidad (Hamer y Stamatakis, 2008, Powers y cols., 2014b).

El entrenamiento físico, tal y como ha sido demostrado por numerosos investigadores usando diversas metodologías experimentales, incrementa la duración del potencial de acción en el miocardio ventricular (Tibbits y cols., 1981, Gwathmey y cols., 1990, Natali y cols., 2002). Como sabemos, el aumento de la duración del potencial de acción en circunstancias de normal perfusión miocárdica, corre paralela a la refractariedad (Wu y cols., 2006). De hecho, posteriores trabajos de investigación experimental han publicado, de modo similar a lo acontecido con la duración del potencial de acción, un incremento de la refractariedad ventricular como uno de los resultados del ejercicio físico crónico aeróbico (Such y cols., 2008, Zarzoso y cols., 2012). Este

1. Introducción.

incremento de la refractariedad se ha publicado que ocurre en deportistas, en otros territorios miocárdicos (Stein y cols., 2002). Además, en los casos que acabamos de comentar, las modificaciones producidas por el entrenamiento físico se ha manifestado en el corazón aislado y por tanto no sometido a influencias nerviosas centrales ni humorales, o en la situación de los deportistas, se ha manifestado en el corazón tras bloqueo del sistema nervioso autónomo. El incremento del tiempo correspondiente al periodo refractario es en sí mismo un posible mecanismo que podría explicar la menor incidencia de arritmias debida a la realización de ejercicio físico regular.

Otro mecanismo que parece estar implicado en el efecto cardioprotector del ejercicio físico es el sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Mace y cols. (2003) realizaron un estudio en un modelo de cardiomiocitos aislados procedentes de ratas ejercitadas y envejecidas sobre NCX, y encontraron que si bien el envejecimiento incrementó la actividad de dicho intercambiador y la duración del potencial de acción, el entrenamiento, aunque aumentó la duración del potencial de acción, no modificó la actividad del sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Collins y cols. (2005) realizaron una investigación experimental sobre la cardioprotección inducida por el ejercicio diario. Estos autores analizaron el efecto del entrenamiento en ratas sedentarias normotensas, hipertensas y entrenadas hipertensas, y encontraron que el ejercicio físico diario aumentó el umbral para la instauración de arritmias ventriculares y que disminuyó la expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ al tiempo que normalizó la expresión de otras proteínas ligadas a los movimientos de calcio como el fosfolamban, que se hallaban anormalmente alteradas en las ratas hipertensas. Estos autores

atribuyeron la menor incidencia de arritmias por el ejercicio físico a la reducción de la alteración de las proteínas reguladoras del calcio. Como contraste, Kukielka y cols. (2011) relataron que en perros sedentarios y susceptibles a la fibrilación ventricular la expresión de NCX₁ estaba aumentada comparada con los perros resistentes a la arritmia, y que el entrenamiento “normalizó” (redujo) su expresión. De este modo, concluyeron que el entrenamiento físico produce una normalización en los niveles de NCX₁, lo que interpretaron, además, como una mejora en la regulación del calcio citosólico y por tanto como un mecanismo protector frente a la instauración de arritmias letales. A diferencia de los anteriores autores, Feger y Starnes (2013), en ratas ejercitadas con protocolos de carrera sobre cinta rodante que generaron hipertrofia cardíaca, aunque encontraron una modificación en la densidad del intercambiador Na⁺/H⁺, no encontraron ninguna diferencia en lo que se refiere a NCX.

Factores postulados que podrían contribuir a tales adaptaciones en los seres humanos, entre otros, el efecto sobre el síndrome metabólico, la reducción de la obesidad, la reducción de la incidencia de la diabetes no dependiente de insulina, la disminución de la presión arterial, la mejora de la perfusión miocárdica, el aumento de la actividad fibrinolítica del plasma y la alteración del perfil lipídico en sangre. Aunque el ejercicio puede mejorar beneficiosamente estos factores de riesgo, se ha publicado que la reducción en la mortalidad puede ocurrir independientemente de los mismos (Billman, 2002). Otros factores propuestos, que operan beneficiosamente a través de la realización de ejercicio, han sido: las mejoras en la circulación coronaria colateral y en la función endotelial, el aumento de las proteínas de estrés del retículo endoplásmico y/o una elevada actividad miocárdica de la enzima ciclooxigenasa 2 y el aumento

1. Introducción.

de la actividad parasimpática por el entrenamiento (para revisión ver Billman y cols., 2009, Powers y cols., 2008 y Powers y cols., 2014b). No obstante se reconocen incertidumbres al respecto y opiniones acerca de que la protección por el entrenamiento puede no deberse sólo al efecto parasimpático tónico (Billman y Kukielka, 2006). Otros autores han informado que el ejercicio mejora la eficiencia mecánica contráctil del miocardio *in vivo* durante los procesos de isquemia reperfusión y que esta protección del miocardio inducida por el ejercicio se asocia con un aumento tanto de las proteínas de choque térmico HSP72, así como de las defensas antioxidantes cardíacas. El entrenamiento se asocia con incrementos significativos en los niveles relativos de las HSP40, HSP60 HSP72 y HSP90 miocárdicas (Hamilton y cols. 2001, Such y cols., 2008). También se ha sugerido el ejercicio regular resulta en una reducción de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial sensible al calcio, en presencia de sustratos del complejo II (Marcil y cols., 2006).

Uno de los actuales enfoques para identificar los mecanismos básicos por los que el ejercicio físico ejerce su efecto protector ha ido dirigido a investigar la participación de la corriente vehiculada por el canal K_{ATP} . Sobre este punto realizamos a continuación un análisis especial.

1.2.5. Análisis especial de la implicación del canal K_{ATP} en los efectos protectores del ejercicio físico crónico.

La implicación del canal de potasio sensible a ATP en los efectos protectores del ejercicio físico crónico ha sido objeto de gran número de investigaciones en la actualidad. Si por un lado, un importante número de autores (que más adelante comentamos) considera que el entrenamiento físico actúa mediante la apertura de dichos canales, que

es lo que ocurre espontáneamente durante la isquemia miocárdica, por otro lado, los resultados obtenidos en estudios en los que se investigó el efecto del entrenamiento sobre las propiedades de la corriente vehiculada por el canal K_{ATP} en cardiomiocitos procedentes de animales sedentarios y entrenados (Jew y cols., 2002), y observaciones realizadas por nuestro grupo (Soler y cols., 2014 y del Canto y cols., 2012) no parecen encajar con la idea de que el ejercicio físico ejerza su efecto protector antiarrítmico a través de la apertura del mencionado canal.

Estudios realizados por Brown y cols. (2005), en corazón aislado de conejo, demostraron que el entrenamiento físico aumentaba la expresión de los canales K_{ATP} de la membrana celular y que la inhibición farmacológica de dichos canales disminuía los efectos beneficiosos del entrenamiento físico contra el daño producido por la isquemia-reperusión. Del mismo modo, Zingma y cols. (2011) corroboraron que la regulación producida por la expresión del canal K_{ATP} parece formar parte del remodelado cardíaco producido por el entrenamiento físico, puesto que se observó un incremento significativo en la expresión de subunidades Kir 6.2 y SUR2A en miocitos ventriculares de ratones entrenados. Asimismo, en un estudio con ratones transgénicos se ha demostrado que los canales K_{ATP} son necesarios para la adaptación del corazón al estrés. En dicho estudio se observó que los ratones modificados genéticamente (sin la subunidad Kir 6.2) eran menos tolerantes al estrés físico y a la estimulación simpática que ratones sin mutación (Zingma, 2002).

Estudios posteriores han intentado dilucidar en qué medida los canales K_{ATP} facilitan la protección antiarrítmica en corazones entrenados durante la isquemia y reperusión. Quindry y cols. (2010), en un estudio realizado en ratas entrenadas a las que se les administraba 5-

1. Introducción.

hidroxidecanoato para bloquear los canales mitoK_{ATP}, y alternativamente, HMR1098, para bloquear los canales sarcK_{ATP}, observaron que la inhibición de los canales mitoK_{ATP} mitigaba los efectos antiarrítmicos del ejercicio, mientras que la inhibición de los canales sarcK_{ATP} no lo hacía. Además, observaron 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 mitoK_{ATP}, lo que hace pensar que es la apertura del canal mitoK_{ATP}, la que proporciona protección antiarrítmica como parte de la cardioprotección mediada por el ejercicio contra la isquemia y reperfusión, (Quindry y cols., 2010).

Zingman y cols. (2011) han planteado que la regulación producida por la expresión del canal de K_{ATP} parece ser parte de la remodelación cardíaca inducida por el ejercicio, demostrando 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, y por lo tanto, con una mayor resistencia a la lesión isquémica del miocardio

Del mismo modo, Brown y cols. (2005), utilizando un modelo de corazón aislado semejante al nuestro, publicaron que el entrenamiento físico aumentaba la expresión de los canales K_{ATP} de la membrana celular y que la inhibición farmacológica de los mencionados canales mitigaba los efectos beneficiosos del ejercicio físico contra el daño producido por la isquemia-reperfusión.

A pesar a lo expuesto anteriormente, hay una gran cantidad de autores que defienden que la apertura del canal K_{ATP} ejerce un efecto deletéreo (Di Diego y Antzelevitch, 1993; ver revisiones de Billman, 2008; y Flagg y cols., 2010). Según esos autores, la activación de los canales K_{ATP} produce un aumento de la salida de potasio y una reducción

de la DPA, pudiendo contribuir significativamente a la inducción de arritmias malignas (ver revisión de Billman, 1994). Es por esta razón que resulta difícil comprender que el ejercicio físico proteja a través de un efecto abridor del canal K_{ATP} o a través de efectos que determinen una mayor actividad de la corriente que vehicula este canal, si tenemos en cuenta que: a) ha sido publicado que el ejercicio físico ejerce un efecto antiarrítmico, b) que la apertura del canal K_{ATP} es arritmogénica, como acabamos de ver, y c) que el bloqueo de este canal es quien ejerce más bien un efecto anti arrítmico.

Lo anteriormente dicho nos hace plantear si los efectos electrofisiológicos beneficiosos del ejercicio físico crónico en el corazón isquémico, se pueden realmente relacionar, al menos en parte, con la activación de la corriente que vehiculan los canales K_{ATP} , a través del estudio de ciertos parámetros electrofisiológicos, tanto en condiciones de normal oxigenación, como tras isquemia regional aguda

1.3. Resumen de la justificación de los objetivos e hipótesis de trabajo.

Dado que: 1. Se ha publicado que ejercicio físico crónico ejerce efectos protectores frente al desencadenamiento de fibrilación ventricular, que es la principal causa de muerte súbita cardíaca; 2. Que de entre los mecanismos básicos propuestos para explicar el efecto protector se ha planteado una mayor actividad de la corriente vehiculada por la apertura del canal de potasio sensible a ATP del sarcolema del cardiomiocito ventricular; 3. Ha sido relatado que la apertura del mencionado canal ejerce un efecto arritmogénico; 4. Este efecto contrasta con el efecto antiarrítmico del ejercicio físico crónico; y 5. Que observaciones previas realizadas por nuestro grupo parecen asemejar

1. Introducción.

más bien el bloqueo, y no la apertura, del canal K_{ATP} a los efectos electrofisiológicos del entrenamiento físico; nos hemos propuesto investigar la similitud o, por el contrario, la discrepancia, entre los efectos, a nivel de algunos parámetros electrofisiológicos relacionados con la instauración de fibrilación ventricular, que produce el ejercicio físico crónico y la apertura del canal K_{ATP} . Estos parámetros los estudiaremos en un modelo de corazón aislado de conejo (no sometido por tanto a influencias nerviosas centrales ni humorales) al que someteremos a isquemia regional aguda, procedentes de un grupo de animales sometidos a un protocolo de ejercicio sobre tapiz rodante, de un grupo tratado con un abridor del canal K_{ATP} y de un grupo control. Con ello podremos encontrar las posibles semejanzas o por el contrario contraposiciones, antes comentadas, entre grupos y contribuir a aclarar aquellos puntos más oscuros en relación a la idea extendida y defendida por la mayor parte de los investigadores, de que el ejercicio físico crónico ejerce su efecto protector a través de un aumento de la corriente vehiculada por los canales K_{ATP} .

Nuestra hipótesis es que el ejercicio físico crónico ejercerá efectos electrofisiológicos contrapuestos a los originados por la apertura del canal K_{ATP} .

1.4. Plan de trabajo.

Para poder alcanzar los objetivos propuestos en la presente tesis doctoral, hemos diseñado el siguiente plan de trabajo:

- En corazón aislado de conejo, normalmente oxigenado, analizaremos el efecto de la apertura del canal K_{ATP} con pinacidil sobre los parámetros relacionados con la refractariedad miocárdica:
 1. Periodo refractario efectivo ventricular obtenido utilizando el test del extraestímulo ventricular (TEEV).
 2. Periodo refractario funcional ventricular obtenido utilizando el TEEV.
 3. Inducibilidad de la FV mediante la aplicación del TEEV.
- Tras la aplicación de los correspondientes test estadísticos, compararemos los resultados de estos parámetros con los procedentes de un grupo control y los procedentes de animales sometidos a un protocolo de entrenamiento físico.
- En corazón aislado de conejo sometido a fibrilación ventricular, sin interrumpir la perfusión, normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda, analizaremos las modificaciones electrofisiológicas producidas por la apertura del canal K_{ATP} , sobre los siguientes parámetros:
 1. Periodo refractario funcional durante la FV.
 2. Intervalos diastólicos del ciclo fibrilatorio (intervalos VV) como parámetro relacionado con la refractariedad.

1. Introducción.

3. Coeficiente de variación del PRFFV, como índice de dispersión de este parámetro y de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio ventricular.
 4. Coeficiente de variación de los intervalos diastólicos del ciclo fibrilatorio (intervalos VV) como índice de heterogeneidad.
 5. Determinación de la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular (parámetro indirecto de refractariedad).
 6. Coeficiente de variación de la frecuencia dominante media (índice de heterogeneidad).
 7. Índice de regularidad de la señal fibrilatoria.
 8. Estabilidad de la FV y reversión de la misma mediante la aplicación de choques eléctricos.
- Tras la aplicación de los correspondientes test estadísticos, compararemos los resultados de estos parámetros con los procedentes de un grupo control y los procedentes de animales sometidos a un protocolo de entrenamiento físico.
 - Una vez realizados el análisis, tratamiento estadístico y la correspondiente discusión referente a los resultados, procederemos a la extracción de las conclusiones más apropiadas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material.

2.1.1. Animales de experimentación: características.

El presente estudio fue realizado en corazones aislados, con un peso medio de $14,5 \pm 2,6$ g y un flujo coronario inicial de $71,0 \pm 14,6$ ml/min, procedentes de conejos macho de raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*). Los conejos fueron alimentados ad libitum y tenían un peso medio al final del periodo de estabulación de $3,7 \pm 0,6$ Kg. Estos animales fueron criados y facilitados por la Granja San Bernardo S.L., llegando al animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València con una edad de 9 semanas. A continuación, fueron estabulados durante un periodo de 7 semanas bajo las siguientes condiciones de estabulación: temperatura entre 21-23°C, humedad relativa del 31% y control en los ciclos de luz alternando la luz artificial con la oscuridad.

2.1.2. Reactivos.

Los reactivos utilizados en cada uno de los experimentos fueron los siguientes:

- ✓ CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , NaH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl y glucosa (Panreac® Química) para la preparación de la solución de Tyrode (líquido nutricional).
- ✓ Heparina sódica al 5% (Rovi®) para la heparinización del animal.
- ✓ Tiopental sódico (B Braun Medical) para el sacrificio del animal.
- ✓ Pinacidil de Sigma® para abrir los canales K_{ATP} dependientes.

2. Material y métodos.

2.1.3. Dispositivos.

2.1.3.1. Pesaje de los animales.

Balanza precisión (Precisa Balances®) modelo GF-2000 y balanza Soehnle®.

2.1.3.2. Entrenamiento de los animales.

Tapiz rodante LE8700 (“treadmill”) de Panlab® S.L. adaptado para el uso en conejos, compuesto por una cinta rodante y una unidad de control (figura 2.1).



Figura 2.1. Tapiz rodante y unidad de control.

2.1.3.3. Infusión del fármaco.

Bomba de infusión *P400 IVAC* (figura 2.2), que fue utilizada para infundir el fármaco pinacidil, de forma continua y a una concentración constante, a través de la raíz aórtica del corazón.



Figura 2.2. Bomba de infusión P400 IVAC.

2.1.3.4. Desfibrilación de los corazones aislados.

Desfibrilador diseñado en la Universidad Politécnica de Valencia gracias a un proyecto de colaboración con el grupo de bioingeniería del instituto ITACA (BioITACA). El desfibrilador está compuesto por una unidad de control y dos palas circulares de metal con un diámetro de 20 mm, éstas se colocan directamente en la superficie epicárdica del corazón para la aplicación del choque y se conectan a la unidad de control, que a su vez, permite aplicar descargas de ondas bifásicas (100 voltios de pico e inversión de polaridad en el 80% del ciclo) con una energía ajustable entre 0,05 y 2,99 julios, con pasos de 0,01 julios. El control de la energía transferida puede ser realizado automáticamente por medio de un microcontrolador que ajusta el tiempo de descarga del condensador.



Figura 2.3. Desfibrilador manual.

2.1.4. Sistemas y programas informáticos.

2.1.4.1. Sistema de perfusión del corazón.

El sistema de perfusión está compuesto por un sistema de soporte metabólico tipo Langendorff, una bomba peristáltica (Cole-Parmer® Instrument Co®) y una bomba circulante de termostatación (Neslab® Instrument, Inc®) que mantiene caliente, a unos 40°, el agua destilada que circula por la cámara externa de la doble camisa del sistema (figura 2.4). Dicho sistema, está formado por varios tubos y cámaras de vidrio, por los que circula el líquido de perfusión, denominado Tyrode, antes de llegar a la cánula de inyección. Este líquido nutritivo, que está compuesto por los siguientes electrolitos y sus correspondientes concentraciones (mM): NaCl: 130; KCl: 5,6; CaCl₂: 2,9; MgCl₂: 0,6; NaH₂PO₄: 1,4.; NaHCO₃: 25 y glucosa: 12; es impulsado desde un depósito exterior, en el que se realiza la oxigenación y ajuste de pH, gracias a la utilización de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂), hasta la parte más elevada por medio de una bomba peristáltica, habiendo pasado previamente por un filtro y un depósito de calentamiento (figura 2.4). La presión de perfusión es

controlada manualmente mediante un manómetro integrado en el sistema.

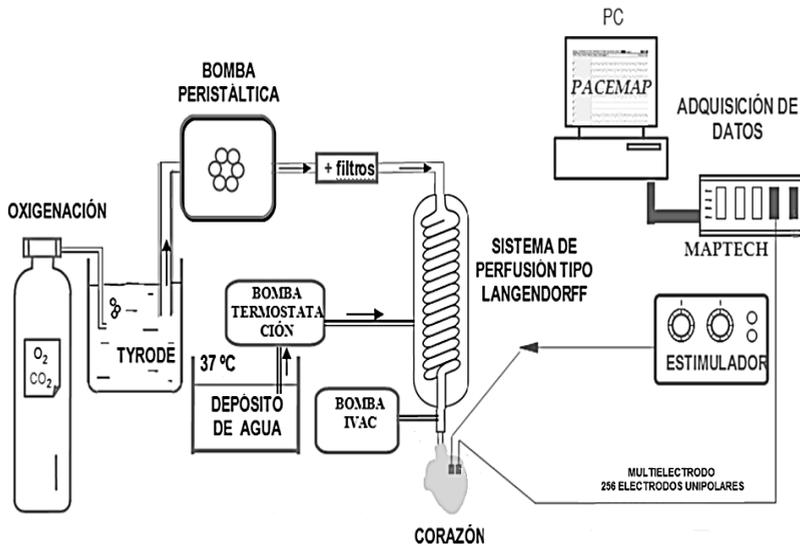


Figura 2.4. Representación del sistema experimental empleado.

El método Langendorff nos permite suministrar al corazón aislado el oxígeno y los metabolitos necesarios, así como el mantenimiento de la temperatura fisiológica gracias a la perfusión del líquido nutricio por medio de una cánula insertada en la aorta ascendente. El líquido nutricio es impulsado a través de la aorta en el sentido contrario al de la circulación sanguínea. Esta perfusión retrógrada a través de la aorta, debido al cierre de las válvulas aórticas, permite la circulación del fluido por las arterias coronarias durante la fase diastólica, como ocurre en el ciclo cardíaco normal. El líquido continúa entonces a través del sistema coronario y tras irrigar a los tejidos cardíacos, desemboca por el ostium del seno coronario en la aurícula derecha. El flujo coronario necesario

2. Material y métodos.

depende del tamaño del corazón. Con esta técnica, las dos cámaras situadas en la parte izquierda del corazón permanecen esencialmente sin líquido y los ventrículos se contraen contra la presión atmosférica de su interior, siendo, por tanto, un sistema de soporte metabólico de corazón aislado sin carga.

2.1.4.2. Sistema de registro.

El sistema de registro de la actividad eléctrica cardíaca está compuesto por los siguientes elementos:

Electrodo bipolar de registro de plata con diámetro de 0,5 mm y una separación interelectrodo de 1 mm, para el registro del auriculograma.

Electrodo múltiple para registro de los electrogramas ventriculares, compuesto por 256 electrodos unipolares de acero inoxidable con un diámetro de 0,125 mm y una distancia interelectrodo de 1 mm (figura 2.5).

Ambos electrodos se conectan a un sistema de cartografía epicárdica.



Figura 2.5. Electrodo múltiple de registro. En esta imagen se pueden apreciar claramente los 256 electrodos unipolares que forman la placa.

Sistema de cartografía de la actividad eléctrica cardíaca (MapTech) para la adquisición, la digitalización y el procesado de las señales electrográficas ventriculares. Los electrogramas se amplificaron con una ganancia comprendida entre 100 y 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 un soporte digital preparado para la adquisición y registro de la actividad eléctrica cardíaca con el fin de poder realizar el posterior análisis de las señales adquiridas.

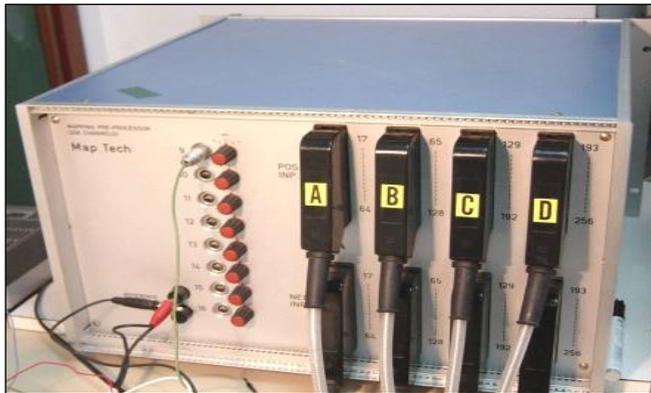


Figura 2.6. Sistema de cartografía MapTech®.

2.1.4.3. Sistema de estimulación.

El sistema de estimulación está compuesto por los siguientes elementos:

Electrodo bipolar de estimulación de acero inoxidable con un diámetro de 0,125 mm y distancia interelectrodo de 1 mm, ubicado en la pared libre del ventrículo izquierdo y conectado al estimulador Grass®.

2. Material y métodos.

Estimulador Grass® El estimulador permite emitir pulsos rectangulares de corriente, con un amplio rango de duraciones, pudiendo controlar parámetros tales como frecuencia de estimulación, intensidad y tiempo de duración del estímulo. De este modo conseguimos una estimulación controlada en una zona concreta y programada gracias a un sistema computarizado que permite emitir pulsos de corriente (figura 2.7).



Figura 2.7. Estimulador Grass® S88 (vista frontal).

2.1.4.4. Programas informáticos.

PaceMap® (año 2002), *software* del sistema de mapeo cardíaco utilizado en la captura y análisis de electrogramas en los experimentos. Este *software* incorporado en el sistema de adquisición *MapTech* permite la visualización canal a canal (figura 2.8) y la realización de diversas determinaciones relacionadas con la cartografía de la actividad eléctrica cardíaca o el marcado de instantes de activación en los electrogramas. Para ello, es necesario definir previamente y proporcionar al programa las matrices de correspondencia electrodo-canal que codificarán la distribución espacial de las señales.

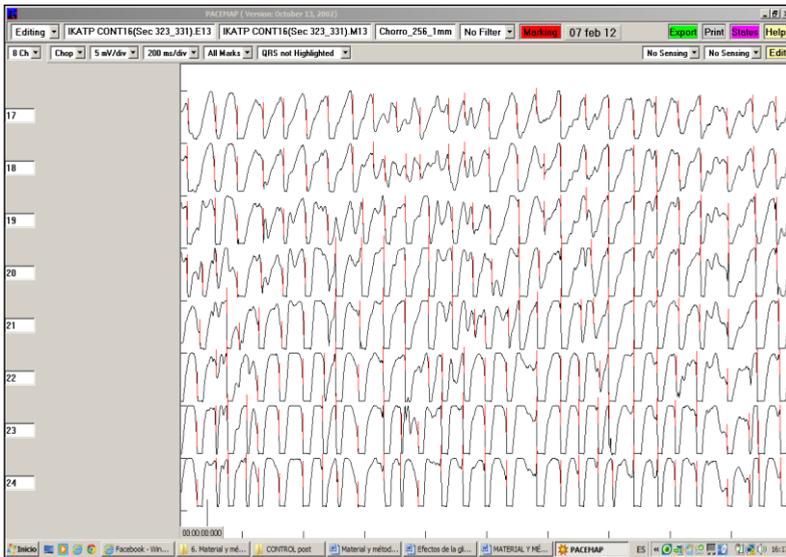


Figura 2.8. Detalle del programa *Pacemap*®.

Matlab® 7.8.0.347 (R2009a), programa que ofrece un entorno de desarrollo integrado con un lenguaje de programación propio, sobre el que se ha programado diversas aplicaciones para el tratamiento de los datos del estudio. Se programó una aplicación con el fin de realizar el análisis de las señales de FV y obtener los parámetros estadísticos que la caracterizan, llamada *MedMap*. Esta aplicación se utilizó para la comprobación y validación de mapas y espectros de frecuencia de las señales de FV. También se utilizó para la visualización de los histogramas de los intervalos VV de la FV y obtención de los parámetros estadísticos a partir de un fichero ASCII de marcas extraído del *PaceMap*®.

SPSS®, paquete estadístico empleado para el análisis estadístico de los resultados (versión 22).

Microsoft Office®, soporte informático con el que se ha realizado el presente manuscrito (versión 2010).

2. Material y métodos.

2.2. Métodos.

2.2.1. Grupos de estudio.

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos experimentales: entrenado, control y tratado con pinacidil (abridor de los canales K_{ATP}). El grupo entrenado compuesto por 11 animales que fueron sometidos a un protocolo de entrenamiento físico durante seis semanas, el grupo control formado por otros 13 animales que no participaron en el protocolo de entrenamiento y que permanecieron estabulados durante dicho periodo y por último, el grupo de animales cuyos corazones aislados fueron tratados con pinacidil, constituido por 8 animales de características similares al grupo control.

2.2.2. Estabulación.

Los conejos permanecieron siete semanas en jaulas individuales 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 agua y pienso (Harlan Teklad Global Rabbit Diet), *ad libitum*.

Para una mejor adaptación se estableció el fotoperiodo artificial de 12 horas (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y se les sometió a una temperatura de entre 21 y 23° C y humedad relativa del 31%, tal y como hemos comentado en el apartado 2.1.1.

2.2.3. Protocolo de entrenamiento físico.

El protocolo de entrenamiento se aplicó durante 6 semanas y consistió en 30 sesiones de carrera en tapiz rodante, a razón de 5 sesiones semanales consecutivas (5 días a la semana durante 6 semanas). Cada sesión se compuso de 6 series de carrera continua durante 4

minutos, con 1 minuto de descanso entre series y una velocidad de 0,33 m/s (20 m/min). Esto supuso un entrenamiento diario de 29 minutos de lunes a viernes con un periodo de descanso de dos días (sábado y domingo).

La supervisión de la correcta realización del ejercicio sobre la cinta rodante fue realizada de forma continua. Los conejos que, una vez iniciado el periodo de entrenamiento, no corrieron adecuadamente durante cinco sesiones consecutivas, fueron excluidos del presente estudio. Tras el periodo de entrenamiento se procedió a la preparación experimental para realizar el estudio electrofisiológico.



Figura 2.9. Animal entrenando en cinta rodante.

Los conejos que no fueron sometidos al protocolo de entrenamiento (grupo control y grupo tratado con pinacidil) permanecieron en jaulas idénticas durante el mismo tiempo que estuvieron los conejos sometidos al protocolo de entrenamiento, esto es, seis semanas más la semana que entraña la familiarización de los conejos con la cinta.

2.2.4. Preparación experimental.

Tras el período de estabulación y/o entrenamiento se procedió a la realización de la preparación experimental (Fig. 2.10) para poder efectuar el protocolo electrofisiológico en corazón aislado. Los animales se sacrificaron mediante una inyección intravenosa de tiopental sódico (60 mg/kg) con 500 u. i. de heparina sódica a través de la vena marginal de la oreja. A continuación y mediante una toracotomía medioesternal y una pericardiotomía, se extrajo el corazón rápidamente, seccionándolo por su pedículo vascular, sumergiéndose en una solución de Tyrode a baja temperatura (1-5°C) para su posterior manipulación sin deterioro metabólico del tejido cardíaco. Tras seccionar la arteria pulmonar y a continuación disecar la arteria aorta ascendente, ésta se seccionó también y se conectó al sistema de Langendorff, mediante hilo de seda de entre 1-2 mm de diámetro, perfundiendo el corazón retrógradamente con la solución de Tyrode a 37 °C. La presión de perfusión inicial se fijó en 60 mm Hg.

Una vez ubicado el corazón en el sistema, se eliminaron los restos de los tejidos adyacentes (pulmón, tráquea, etc.) y mediante una pequeña sección en la aurícula izquierda, se procedió al corte de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral para hacerla insuficiente y permitir el escape, en caso que fuera necesario, del líquido por la aurícula izquierda, evitando así posibles acumulaciones de Tyrode en el ventrículo izquierdo, si se diera la situación de que la válvula aórtica mostrara cierta insuficiencia, para evitar la creación accidental de un modelo de *working heart* no deseado.

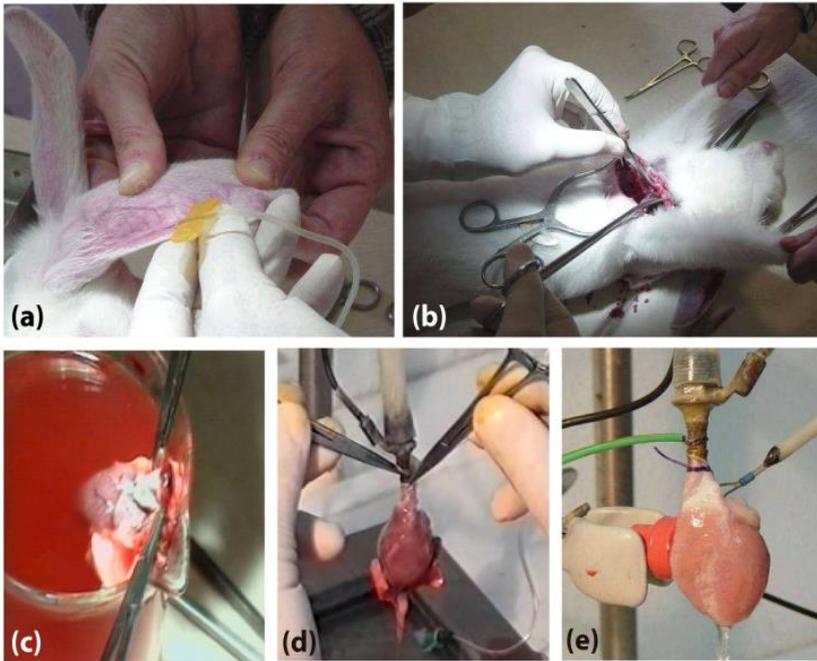


Figura 2.10. Distintos momentos de la preparación experimental: inyección de tiopental a través de la vena marginal izquierda para sacrificio del animal (a), extracción del corazón mediante toracotomía y pericardiotomía (b), corazón sumergido en la solución de Tyrode frío (c), inserción de la aorta en la cánula del sistema (d) y preparación fijada al sistema (e).

El líquido de perfusión, ubicado y oxigenado en un depósito exterior, es el que le aporta al corazón los nutrientes, oxígeno y dióxido de carbono necesarios y es impulsado a los vasos coronarios de forma normógrada gracias a una bomba peristáltica que conduce al líquido nutricio hasta la parte más elevada del sistema de Langendorff. Todo ello tras un filtrado previo con un filtro de membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 3 μm , adecuado para evitar el paso de partículas que pudiesen causar una posible obstrucción de los vasos coronarios. Una vez introducido en el sistema tubular, el Tyrode se mantiene caliente ya que el sistema posee una doble camisa por donde pasa el agua que lo

2. Material y métodos.

atempera, para ello empleamos una bomba circulante de termostatación, consiguiendo alcanzar la temperatura idónea de 37°C en la raíz aórtica. Finalmente, y antes de la colocación de los electrodos, se circundó la arteria coronaria circunfleja con seda trenzada 2-0 (TC-12 / CT 20 mm 1/2) gamma estéril® de Laboratorio Aragón, s.a.

A continuación se colocaron los electrodos del siguiente modo: se ubicaron dos electrodos bipolares, revestidos de plata, uno para el registro del electrograma auricular y otro en el ventrículo izquierdo para su estimulación eléctrica (figura 2.11.). El registro de la actividad eléctrica ventricular se realizó por medio de un electrodo múltiple con 256 electrodos unipolares de acero inoxidable. El electrodo múltiple fue colocado en la superficie epicárdica de la pared lateral del ventrículo izquierdo (en la zona más prominente). La grabación de los registros fue obtenida con un sistema de cartografía de la actividad eléctrica cardíaca (MapTech®), como se ha comentado anteriormente.

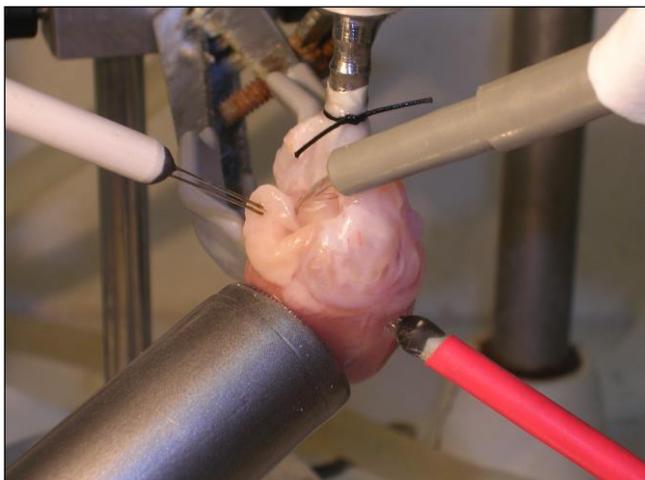


Figura 2.11. Ubicación de los diferentes electrodos sobre la superficie epicárdica cardíaca.

2.2.5. Protocolo experimental.

Tras ubicar el corazón en el sistema de Langendorff y situar los electrodos correspondientes, tal y como se ha detallado anteriormente, y pasado un tiempo de estabilización de 20 minutos, se procedió a la realización del siguiente protocolo experimental, llevado a cabo en los tres grupos experimentales:

1. Estimación del flujo coronario, para calcular la velocidad de infusión. Para ello se recogió en un vaso de precipitados el Tyrode que drena desde la arteria pulmonar durante 1 minuto.
2. Cálculo de la velocidad de infusión. Multiplicando el volumen de Tyrode recogido en 1 minuto por 60 (para extrapolarlo a 1 hora) y dividiendo entre 100 (factor de dilución empleado) obtenemos una aproximación del flujo coronario en ml/h.
3. Registro electrográfico basal, durante 10 s, para la determinación de la frecuencia cardíaca.
4. Determinación de umbrales de excitación ventricular.
5. Test del extraestímulo ventricular (TEEV) para el estudio de la refractariedad ventricular.
6. Infusión de la solución de Tyrode (con DMSO) en la raíz aórtica (grupo control y entrenado) o de solución de pinacidil 1mM (con un flujo 100 veces menor al del flujo coronario, para que llegue a la circulación coronaria a una concentración de 10 μ M), desde este punto hasta la finalización del protocolo.
7. Se repite el registro electrográfico basal durante 10s, para la determinación de la frecuencia cardíaca post-infusión.

2. Material y métodos.

8. Se repite el test del extraestímulo ventricular (TEEV) para el estudio de la refractariedad ventricular post-infusión.
9. Inducción de la fibrilación ventricular (FV) a través de la estimulación ventricular a frecuencias crecientes y a una intensidad de estimulación triple del umbral diastólico. Se registró la entrada en fibrilación, deteniéndose en este momento la estimulación programada.
10. Registro continuo de 5 minutos y medio de la actividad fibrilatoria, manteniéndose en todo momento la perfusión.
11. Pasados los 5 minutos y medio de FV y durante la misma, se procedió a ocluir la arteria coronaria circunfleja (ACC). La oclusión se realizó pasando una aguja de sutura con 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 ST observado en los diferentes electrogramas ventriculares epicárdicos obtenidos una vez finalizado el experimento.
12. Posteriormente a la oclusión coronaria se realizó un registro continuo de 5 minutos y medio de FV, así como, registros de 10 segundos de fibrilación, en cada minuto, empezando en el minuto 6 y finalizando en el minuto 10.
13. Tras este tiempo, se procedió a revertir la FV para la determinación del umbral de desfibrilación (UD), para ello se utilizó un desfibrilador manual aplicando choques de ondas bifásicas con una energía base de 0,05 julios e incrementos en cada intento de 0,01 julios hasta conseguir una desfibrilación estable del corazón.

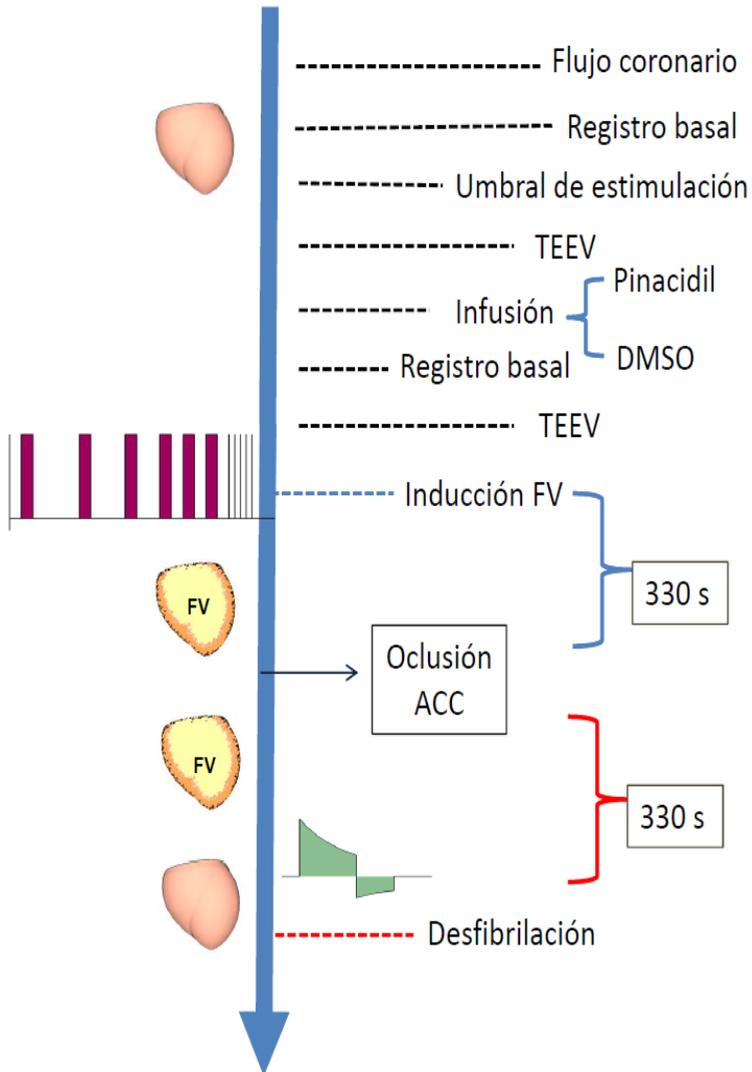


Figura 2.12. Esquema del protocolo experimental.

2.2.6. Definición y determinación de los parámetros electrofisiológicos estudiados.

2.2.6.1. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la refractariedad miocárdica:

Previamente a la definición de estos parámetros, ilustramos en la siguiente figura, de forma genérica, un electrograma correspondiente al test del extraestímulo ventricular (TEEV) para facilitar la comprensión de los parámetros obtenidos a partir de dicho test.

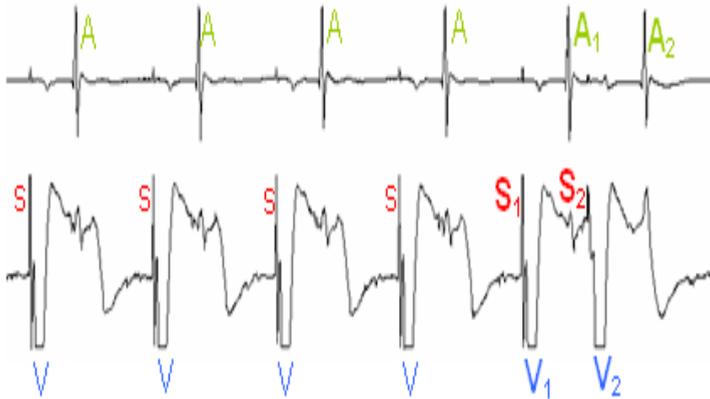


Figura 2.13. Representación gráfica del test del extraestímulo ventricular (TEEV) en la que se observa los siguientes elementos: artefacto del estímulo del tren (S); electrograma auricular (A); electrograma ventricular (V); artefacto del último estímulo del tren (S₁); electrograma ventricular generado por el último estímulo del tren (V₁); electrograma auricular generado por la despolarización ventricular V₁ en conducción retrógrada (A₁); artefacto del extraestímulo (S₂); electrograma ventricular generado por el extraestímulo (V₂); electrograma auricular generado por la despolarización ventricular V₂ en conducción retrógrada (A₂).

Período refractario efectivo ventricular en TEEV.

PREV: es el máximo intervalo de acoplamiento del extraestímulo ventricular (S₁-S₂) sin captura ventricular (S₂ sin V₂).

Periodo refractario funcional ventricular en TEEV.

PRFV: es el mínimo intervalo entre el electrograma ventricular producido por el último estímulo del tren base ventricular y el desencadenado con el extraestímulo (mínimo intervalo V_1-V_2).

A continuación detallamos el proceso de marcaje de las señales fibrilatorias para la obtención del periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular y de los intervalos de activación ventricular (V-V).

A partir de los registros electrográficos se obtuvo la activación local en cada uno de los 256 electrodos que forman el multielectrodo identificando el instante de la pendiente máxima negativa (dV/dt) de los electrogramas ventriculares y efectuando el marcaje semiautomático de dichas pendientes durante 2 segundos en FV mantenida, precisamente antes de la oclusión coronaria, que se llevaba a cabo pasados 5 minutos y medio de FV y 5 minutos y medio después de dicha oclusión. Se estableció un umbral que debía superar la deflexión para ser considerada como una deflexión local. Dicho umbral se corresponde con el 20% del máximo valor de amplitud en cada electrograma. Cuando los electrogramas mostraban potenciales dobles o múltiples, la máxima pendiente negativa del complejo de activación fue asignada como el único tiempo de activación local. A partir de este análisis en el dominio del tiempo se obtuvieron los intervalos VV, en dos situaciones: pre-oclusión y post-oclusión, en los tres grupos objetos de este estudio: tratado con pinacidil (abridor del K_{ATP}), control y entrenado.

Periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.

PRFFV: La refractariedad del tejido ha sido valorada a través de la medida del PRF, definiéndolo como el percentil 5 de los intervalos VV

correspondiente al histograma formado por el conjunto de dichos intervalos. El percentil 5 de los intervalos VV se ha obtenido a partir de los citados histogramas mediante el programa informático PaceMap (figura 2.14).

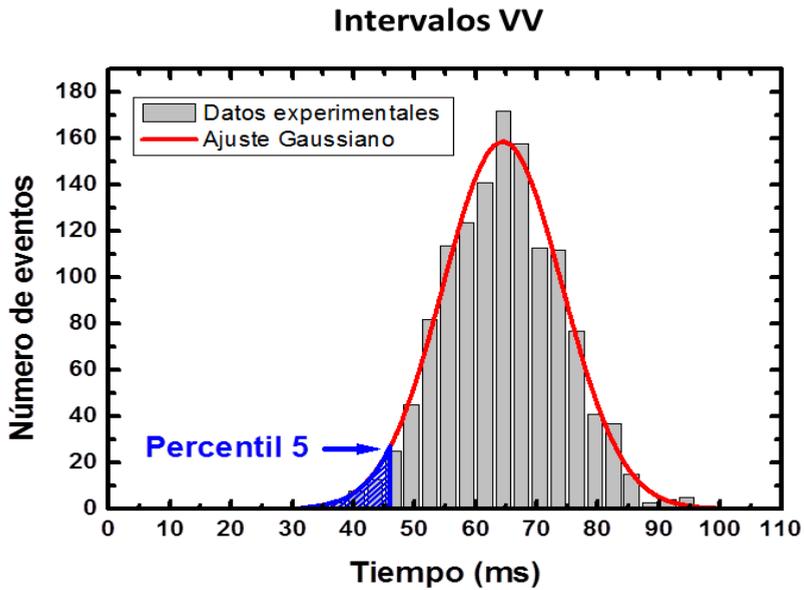


Figura 2.14. Representación de la distribución gaussiana a partir de los intervalos VV. El percentil 5 corresponde al área sombreada en azul bajo la línea del ajuste gaussiano.

2.2.6.2. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la heterogeneidad electrofisiológica de la FV:

Coeficiente de variación (CV): nos permite obtener una medida de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio ventricular.

Coeficiente de variación de la media de los intervalos VV.

CV_{VV} : Calculado como el cociente de la desviación típica de los VV sobre el VV medio multiplicado por 100.

Coefficiente de variación del PRFFV.

CV_{PRFFV} : Calculado como el cociente de la desviación típica del PRFFV sobre el PRFFV medio multiplicado por 100.

Coefficiente de variación de la frecuencia dominante (FD).

CV_{FD} : Calculado como el cociente de la desviación típica de la FD media sobre la FD media multiplicado por 100.

Además de los parámetros citados anteriormente, utilizamos como medida indirecta de la heterogeneidad electrofisiológica el índice de regularidad (IR).

Índice de regularidad.

IR: Utilizado para analizar la regularidad morfológica de la señal fibrilatoria, se obtuvo para cada electrodo a partir de la adaptación de un modelo propuesto por Faes y cols. (2002) en la fibrilación auricular. Este índice permite cuantificar en un rango de 0 a 1, la regularidad de la señal analizando la similitud de las ondas de activación local en el segmento considerado. El algoritmo comprende: a) filtrado paso banda para eliminar oscilaciones, actividad auricular y ruido de alta frecuencia; b) detección de las ondas de activación locales; c) obtención de los tiempos de activación; d) normalización de las ondas de activación local, y e) cálculo de las diferencias entre las ondas de activación para evaluar su similitud (Such-Miquel y cols., 2013).

2.2.6.3. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la frecuencia de activación de la FV:

La frecuencia dominante (FD) de la fibrilación ventricular aporta información directamente relacionada con los ciclos de activación y

2. Material y métodos.

permite obtener de manera rápida información sobre los cambios locales y temporales en los procesos de activación durante la fibrilación ventricular (Such-Miquel y cols., 2013).

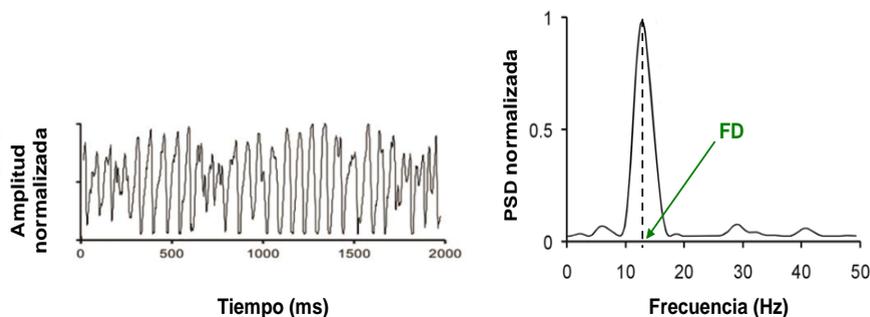


Figura 2.15. Serie temporal de un trazado fibrilatorio registrado por uno de los 256 electrodos ventriculares (izquierda) y espectro de potencia de una señal de fibrilación ventricular (derecha) La frecuencia dominante es la frecuencia con el pico máximo de densidad espectral de potencia. Abreviaturas: PSD = densidad espectral de potencia; FD = frecuencia dominante; Hz = hercios

La FD se expresa en Hz y se define como la frecuencia a la que la distribución espectral de potencia de la señal presenta la máxima amplitud (Ropella, 2001). Tras la descomposición de la señal de fibrilación ventricular, gracias a la transformada de Fourier, en sus distintos armónicos, la senoide que coincide con aquél armónico que posee la mayor amplitud, representa la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular (Fig.2.16).

Frecuencia dominante media de la fibrilación ventricular.

FD_M: La frecuencia dominante media 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. El procesamiento de datos fue efectuado mediante el programa informático Matlab® 7.6 dentro de la aplicación Medmap.

Intervalos VV o intervalos de activación ventricular.

Se definen como el tiempo transcurrido entre dos activaciones locales consecutivas en el ventrículo. Como queda expresado en la figura 2.15, el programa informático determina automáticamente la distancia en ms entre dos activaciones ventriculares. Es una medida en el dominio del tiempo del trazado fibrilatorio.

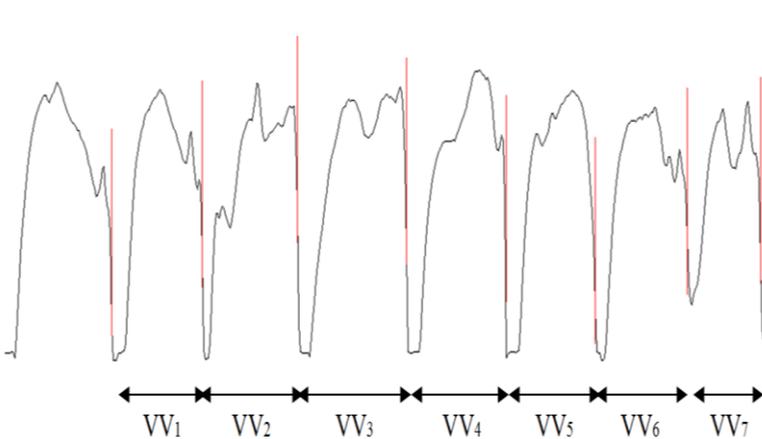


Figura 2.16. Registro electrográfico de FV en el que se pueden apreciar las marcas efectuadas de forma semiautomática sobre los momentos de activación del proceso fibrilatorio, y consecuentemente los intervalos VV entre dichos momentos.

Media de los intervalos VV.

M_{VV} : 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. A continuación se obtuvo la media y desviación típica de la distribución de dicho parámetro para cada grupo de experimentación.

2.2.6.4. Parámetros utilizados para la valoración de la inducibilidad (arritmogénesis) y la reversión de la fibrilación ventricular:

Inducibilidad de la fibrilación ventricular.

Se ha definido como la facilidad para desencadenar la fibrilación ventricular a través de la aplicación del test del extraestímulo ventricular (TEEV).

Reversión de la fibrilación ventricular.

Se ha definido como la capacidad para revertir la fibrilación ventricular mediante la aplicación de choques de ondas bifásicas con una energía ajustable entre 0,05 y 2,99 julios, con pasos de 0,01 julios.

Umbral desfibrilatorio.

Definido como la energía mínima necesaria aplicada mediante el desfibrilador de doble pala, con el fin de interrumpir el proceso fibrilatorio.

2.3. Análisis estadístico.

Previamente a la aplicación de cualquier test estadístico inferencial se comprobó la normalidad de los datos. Para la comparación de los parámetros de estudio descritos anteriormente se utilizó la prueba t para muestras independientes y relacionadas, el ANOVA de un factor entre sujetos, el ANOVA factorial mixto y la prueba de chi cuadrado, según correspondiese en función de las comparaciones a realizar. Las diferencias observadas se han considerado estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$.

2.4. Legislación.

Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales usados en la presente tesis doctoral se realizaron de acuerdo con 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.

3. RESULTADOS

A continuación describiremos los resultados correspondientes a los diferentes parámetros electrofisiológicos estudiados en la presente tesis. Para una mejor comprensión y una mayor claridad en la exposición, se ha dividido cada uno de los apartados conforme a la metodología descrita.

En primer lugar, presentaremos los resultados correspondientes al peso de los animales, peso de los corazones y flujo coronario.

3.1. Peso de los animales y de los corazones.

En la tabla 3.1 quedan expuestos el peso de los animales y de los corazones de los diferentes grupos experimentales. Como podemos observar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, tanto en el peso de los animales como en el peso de los corazones.

	Peso animales (Kg)	Peso corazones (g)
Control (13)	3,6 ± 0,2	14,3 ± 1,8
Entrenado (11)	3,6 ± 0,3	15,4 ± 1,5
Pinacidil (8)	3,8 ± 0,3	13,7 ± 0,9

Tabla 3.1. Peso de los animales de experimentación y de los corazones aislados. Se muestran medias y desviaciones típicas. Número de experimentos entre paréntesis.

3.2. Flujo coronario.

En la siguiente tabla presentamos los valores correspondientes al flujo coronario y flujo coronario normalizado por el peso de los corazones de los distintos grupos experimentales. Como podemos observar, se

3. Resultados.

encontraron diferencias estadísticamente significativas en el flujo coronario en el grupo pinacidil, que fue menor respecto a los grupos control y entrenado. Sin embargo, cuando analizamos el flujo coronario normalizado por el peso de los corazones, éste fue significativamente menor en el grupo pinacidil al compararlo con el grupo control, pero no se encontraron diferencias con el grupo entrenado.

	Flujo coronario (ml/min)	Flujo coronario normalizado (ml·min⁻¹·g⁻¹)
Control (13)	71,3 ± 10,2	5,1 ± 0,7
Entrenado (11)	74,8 ± 10,9	5,0 ± 1,0
Pinacidil (8)	64,1 ± 8,4 ^{#†}	4,5 ± 0,5 [†]

Tabla 3.2. Flujo coronario y flujo coronario normalizado por el peso de los corazones. Se muestran las medias y desviaciones típicas. [#]p<0,05 respecto a entrenado. [†]p<0,05 respecto a control. Número de experimentos entre paréntesis.

En segundo lugar, presentaremos los resultados correspondientes a la refractariedad miocárdica, la heterogeneidad electrofisiológica miocárdica, la frecuencia de la activación de la fibrilación ventricular y la arritmogénesis.

3.3. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la refractariedad miocárdica.

3.3.1. Periodo refractario efectivo ventricular obtenido utilizando el TEEV.

En la figura 3.1 observamos los resultados correspondientes a la media del periodo refractario efectivo ventricular (PREV) obtenido utilizando el test del extraestímulo ventricular (TEEV) con una longitud

del ciclo de estimulación un 10% menor a la longitud de ciclo sinusal basal, previa (pre-infusión) y posteriormente a la infusión (post-infusión) de DMSO, en el caso de los grupos control y entrenado, y pinacidil en el caso del grupo tratado. Cuando analizamos el efecto de la infusión no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los grupos control (114 ± 11 vs 115 ± 15 ms, ns) y entrenado (122 ± 20 vs 123 ± 20 ms, ns). Sin embargo, al infundir el pinacidil el PREV disminuyó (113 ± 13 vs 92 ± 10 ms, $p < 0,05$).

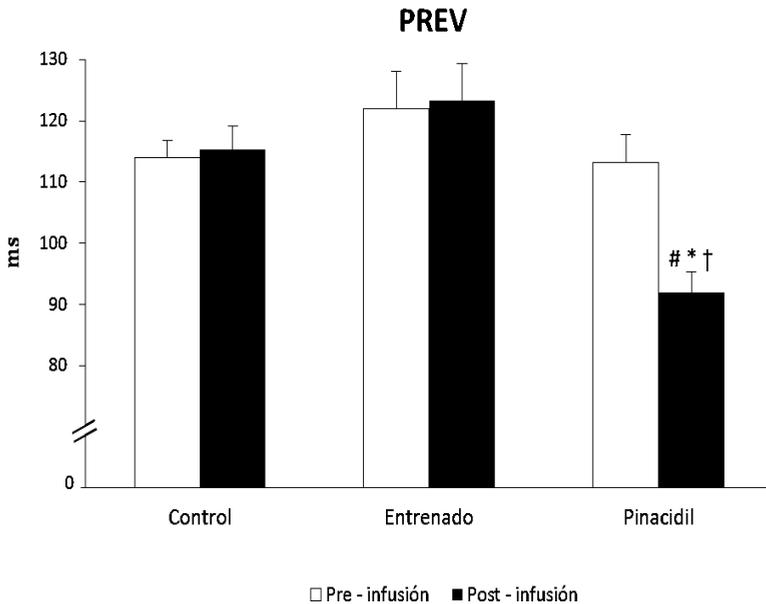


Figura 3.1. Periodo refractario efectivo ventricular antes y después de la infusión. Los valores están expresados en milisegundos. Grupo control $n = 13$, grupo entrenado $n = 11$ y grupo pinacidil $n = 8$. † $p < 0,05$ respecto a control. # $p < 0,05$ respecto a entrenado. * $p < 0,05$ respecto al valor previo a la infusión. Las barras de error corresponden al error típico.

Cuando realizamos una comparación entre grupos, previamente a la infusión, observamos que el PREV tendió a ser mayor en el grupo entrenado al compararlo con el grupo control ($p = 0,06$) y pinacidil ($p = 0,08$). Entre los grupos control y pinacidil no se encontraron diferencias

3. Resultados.

estadísticamente significativas. Tras la infusión, el PREV fue menor en el grupo tratado con pinacilil al compararlo con los grupos control y entrenado ($p < 0,05$), lo cual significa que dicho fármaco produjo un acortamiento de la refractariedad miocárdica.

3.3.2. Periodo refractario funcional ventricular obtenido utilizando el TEEV.

En la figura 3.2 observamos los resultados correspondientes a la media del periodo refractario funcional ventricular (PRFV) obtenido utilizando el TEEV. Este parámetro fue determinado antes y después de la infusión de pinacilil, en el caso del grupo tratado y de DMSO en el caso de los otros dos grupos de experimentación.

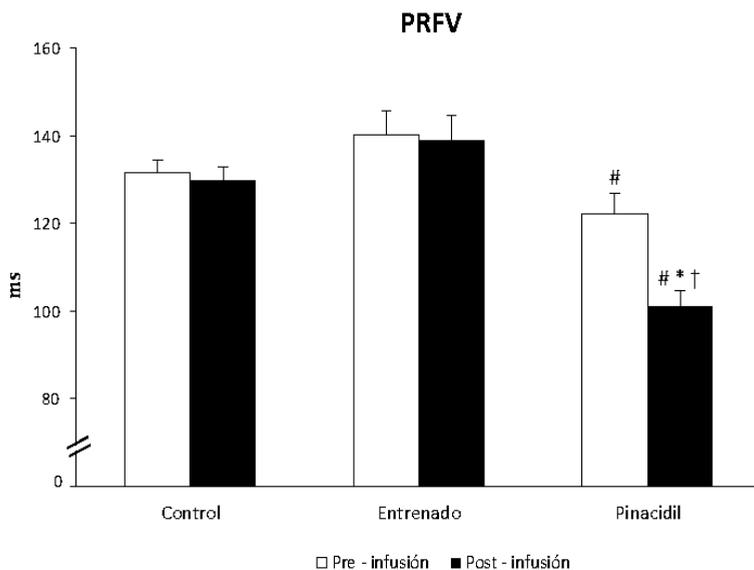


Figura 3.2. Periodo refractario funcional ventricular antes y después de la infusión. Los valores están expresados en milisegundos. Grupo control $n = 13$, grupo entrenado $n = 11$ y grupo pinacilil $n = 8$. † $p < 0,05$ respecto a control. # $p < 0,05$ respecto a entrenado. * $p < 0,05$ respecto al valor previo a la infusión. Las barras de error corresponden al error típico.

Cuando analizamos el efecto de la infusión no hallamos diferencias estadísticamente significativas en los grupos control (132 ± 10 vs 130 ± 11 ms, ns) y entrenado (140 ± 18 vs 139 ± 19 ms, ns). Sin embargo, al infundir el pinacidil, observamos un acortamiento del PRFV, lo que demuestra que dicho fármaco alteró la refractariedad miocárdica (122 ± 13 vs 101 ± 10 ms, $p < 0,05$). Cuando realizamos una comparación entre grupos previamente a la infusión, observamos que el PRFV tendió a ser mayor en el grupo entrenado al compararlo con el grupo control ($p = 0,07$) y fue significativamente mayor al compararlo con el grupo pinacidil ($p = 0,01$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y pinacidil.

3.3.3. Periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.

En la figura 3.3 observamos los resultados correspondientes a la media de los periodos refractarios funcionales determinados durante la FV (PRFFV), antes y después de la oclusión coronaria. Cuando analizamos el efecto de la oclusión coronaria en la refractariedad durante la FV, encontramos que en el grupo entrenado no hubo diferencias significativas al comparar los valores antes y después de la oclusión (47 ± 5 vs 47 ± 6 ms, ns). Sin embargo, la oclusión coronaria produjo un alargamiento de la refractariedad miocárdica, en el caso del grupo control (43 ± 4 vs 47 ± 5 ms, $p < 0,05$) y del grupo tratado con pinacidil (25 ± 2 vs 27 ± 4 , ms, $p < 0,05$) tras 5 minutos de oclusión.

Cuando comparamos el PRFFV del grupo entrenado frente al grupo control, previamente a la oclusión coronaria, encontramos que este parámetro fue significativamente mayor en el grupo entrenado (47 ± 5 vs 43 ± 4 ms, $p < 0,05$). Asimismo, previamente a la oclusión coronaria, el PRFFV fue menor en el grupo tratado con pinacidil al compararlo con

3. Resultados.

el grupo entrenado (25 ± 2 vs 47 ± 5 ms, $p < 0,05$) y con el grupo control (25 ± 2 vs 43 ± 4 ms, $p < 0,05$).

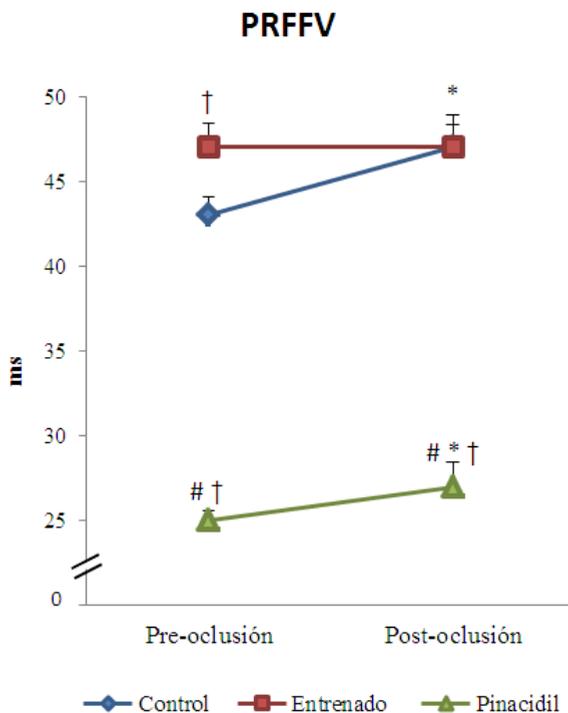


Figura 3.3. PRFFV, en los grupos control, entrenado y pinacidil, previamente a la oclusión y tras 5 minutos de la misma. Los valores están expresados en milisegundos. Grupo control $n = 13$, grupo entrenado $n = 11$ y grupo pinacidil $n = 8$. † $p < 0,05$ respecto a control. # $p < 0,05$ respecto a entrenado. * $p < 0,05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras de error corresponden al error típico.

Tras 5 minutos de oclusión coronaria, éstas diferencias entre grupos se mantuvieron entre el grupo tratado con pinacidil y los grupos control y entrenado. Sin embargo, no se observaron diferencias en el PRFFV entre el grupo entrenado y el grupo control, debido a que en el grupo control se produjo un incremento del PRFFV mientras que en el grupo entrenado este parámetro no se vio modificado por la isquemia.

3.4. Parámetros utilizados para la valoración de la heterogeneidad electrofisiológica de la FV.

3.4.1. Coeficiente de variación del PRFFV.

A partir de los periodos refractarios funcionales obtenidos durante la fibrilación ventricular y sus correspondientes medias y desviaciones típicas calculamos el coeficiente de variación del PRFFV, como medida de heterogeneidad electrofisiológica miocárdica (figura 3.4).

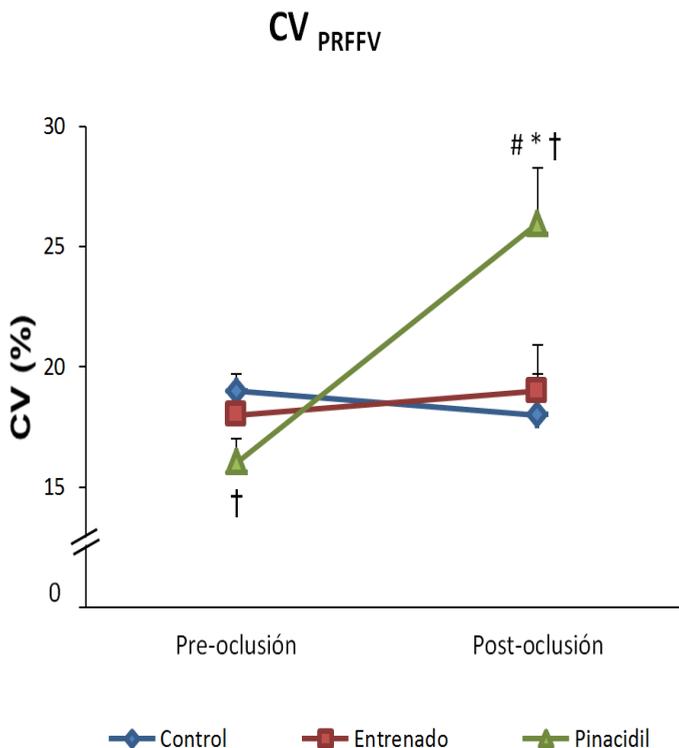


Figura 3.4. Dispersión de los periodos refractarios funcionales durante la FV (PRFFV), en los grupos control, entrenado y pinacidil, antes y después de 5 minutos de la oclusión coronaria. Grupo control n = 13, grupo entrenado n = 11 y grupo pinacidil n = 8. †p < 0,05 respecto a control. #p < 0,05 respecto a entrenado. *p < 0,05 respecto al valor previo a la oclusión. Las barras de error corresponden al error típico.

3. Resultados.

Cuando realizamos una comparación entre grupos previamente a la oclusión coronaria observamos que la heterogeneidad en el grupo tratado con pinacidil fue ligeramente menor al compararlo con el grupo control (16 ± 2 vs 19 ± 2 %, $p < 0,05$).

La oclusión coronaria no modificó el CV del PRFFV en el grupo control ni en el grupo entrenado. Sin embargo, sí lo hizo en el grupo tratado, el cual presentó mayor heterogeneidad tras 5 minutos de oclusión (16 ± 2 vs 27 ± 2 %, $p < 0,05$). Asimismo, cuando realizamos una comparación entre grupos posteriormente a la oclusión, encontramos una mayor heterogeneidad en el grupo tratado con pinacidil al compararlo tanto con el grupo entrenado (27 ± 2 vs 19 ± 4 %, $p < 0,05$) como con el grupo control (27 ± 2 vs 18 ± 3 %, $p < 0,05$).

3.4.2. Coeficiente de variación de los intervalos VV.

En la figura 3.5 mostramos los resultados correspondientes al coeficiente de variación de los intervalos VV (CV_{VV}), como medida de heterogeneidad electrofisiológica miocárdica. Cuando analizamos el efecto de la oclusión coronaria en cada uno de los grupos experimentales, hallamos un incremento estadísticamente significativo de este parámetro.

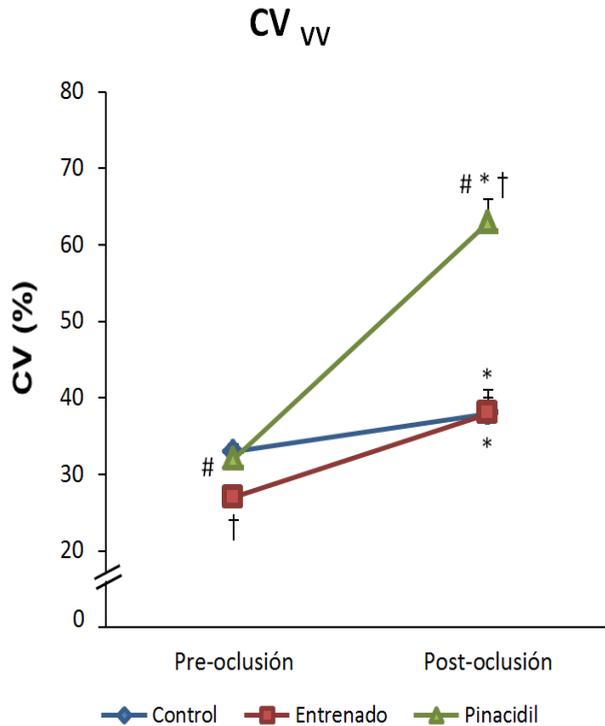


Figura 3.5. Coeficiente de variación de los intervalos VV (CV_{VV}), en los grupos control, entrenado Y pinacidil, antes y después de 5 minutos de la oclusión coronaria. Grupo control $n = 13$, grupo entrenado $n = 11$ y grupo pinacidil $n = 8$. † $p < 0,05$ respecto a control. # $p < 0,05$ respecto a entrenado. * $p < 0,05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras de error corresponden al error típico.

Previamente a la oclusión coronaria, el valor del CV_{VV} en el grupo entrenado fue significativamente menor al compararlo con los grupos control (27 ± 4 vs 33 ± 5 %, $p < 0,05$) y pinacidil (27 ± 4 vs 32 ± 2 %, $p < 0,05$). Entre estos dos últimos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Tras 5 minutos de oclusión, el grupo tratado con pinacidil presentó un CV_{VV} significativamente mayor, al compararlo con el grupo control (64 ± 16 vs 38 ± 3 %, $p < 0,05$) y entrenado (64 ± 16 vs 38 ± 6 %, $p < 0,05$).

3.4.3. Coeficiente de variación de la FD de la FV.

En la figura 3.6 observamos los resultados referentes al coeficiente de variación de la frecuencia dominante de la FV analizados previamente a la oclusión y 3 minutos después de la misma, como medida de heterogeneidad electrofisiológica miocárdica.

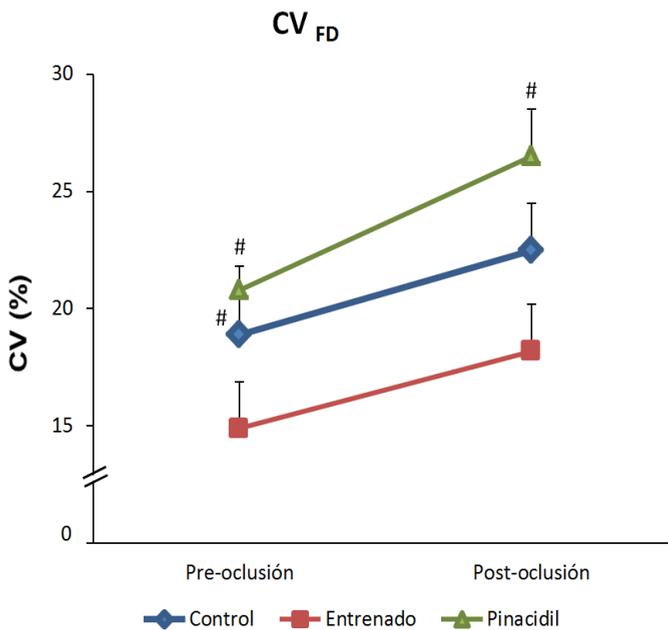


Figura 3.6. Coeficiente de variación de la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular (CV_{FD}) en los grupos control, entrenado y pinacidil, antes y después de 3 minutos de la oclusión coronaria. Grupo control $n = 13$, grupo entrenado $n = 11$ y grupo pinacidil $n = 8$. # $p < 0,05$ respecto a entrenado. Las barras de error corresponden al error típico.

Cuando analizamos el efecto de la oclusión dentro de cada grupo no hallamos diferencias estadísticamente significativas entre el valor previo a la oclusión y el determinado a los 3 minutos tras la misma. El valor del CV_{FD} en el grupo entrenado fue significativamente menor que el

grupo control (15 ± 2 vs 19 ± 2 %, $p < 0,05$) y que el grupo tratado con pinacidil (15 ± 2 vs 21 ± 1 %, $p < 0,05$) al realizar la comparación previamente a la oclusión coronaria. Tras 3 minutos de oclusión encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos entrenado y pinacidil, siendo mayor el CV_{FD} en este último grupo (18 ± 6 vs 26 ± 8 %, $p < 0,05$).

3.4.4. Índice de regularidad.

En la figura 3.7 mostramos los resultados correspondientes al índice de regularidad de la señal fibrilatoria como medida indirecta de heterogeneidad electrofisiológica miocárdica.

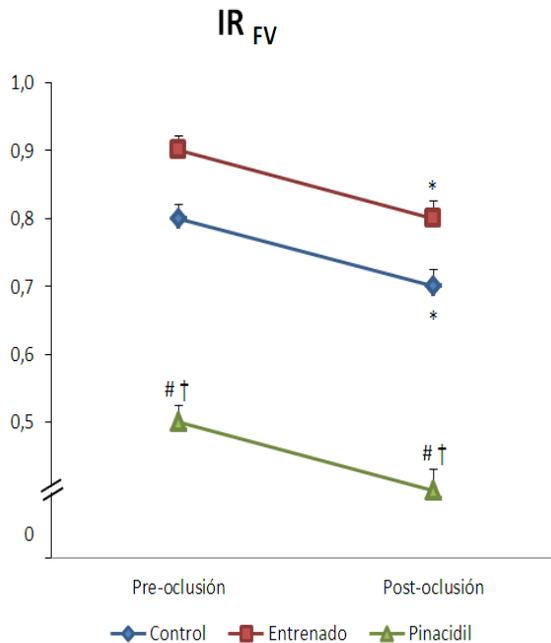


Figura 3.7. Índice de regularidad de la señal fibrilatoria (IR_{FV}) en los grupos control, entrenado pinacidil, antes y después de 5 minutos de la oclusión coronaria. Grupo control $n = 13$, grupo entrenado $n = 11$ y grupo pinacidil $n = 8$. † $p < 0,05$ respecto a control. # $p < 0,05$ respecto a entrenado. * $p < 0,05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras de error corresponden al error típico.

3. Resultados.

Como podemos observar, la oclusión coronaria produjo una disminución en la regularidad de la señal tras 5 minutos de oclusión en los grupos entrenado ($0,87 \pm 0,02$ vs $0,79 \pm 0,03$, $p < 0,05$) y control ($0,85 \pm 0,02$ vs $0,76 \pm 0,02$, $p < 0,05$). Por otro lado, el grupo tratado con pinacidil, que ya presentaba un menor IR antes de la oclusión, no se vio afectado por la isquemia ($0,48 \pm 0,03$ vs $0,44 \pm 0,03$, ns). Cuando comparamos este parámetro entre los grupos de experimentación, hallamos que el grupo tratado con pinacidil presentó un IR menor que los grupos control y entrenado, tanto antes como después de la oclusión.

3.5. Parámetros utilizados para la valoración de la frecuencia de activación de la FV.

3.5.1. Frecuencia dominante media (FDM) de la fibrilación ventricular.

En la figura 3.8 podemos observar los resultados correspondientes a la FDM de la FV, este parámetro fue determinado antes de la oclusión y en los minutos 1, 2 y 3 posteriores a la misma.

Cuando analizamos el efecto de la oclusión en la frecuencia dominante media en cada grupo, encontramos que dicho parámetro descendió significativamente tras la oclusión coronaria en todos los tiempos analizados tanto en el grupo control (pre: 15 ± 3 , post1: 11 ± 1 , post2: 11 ± 1 y post3: 12 ± 3 Hz, $p < 0,05$) como en el tratado con pinacidil (pre: 26 ± 3 , post1: 23 ± 3 , post2: 24 ± 3 y post3: 23 ± 3 Hz, $p < 0,05$). Sin embargo, en el grupo entrenado la frecuencia dominante media se mantuvo tras la oclusión (pre: 13 ± 1 , post1: 12 ± 2 , post2: 13 ± 2 y post3: 14 ± 2 Hz, ns).

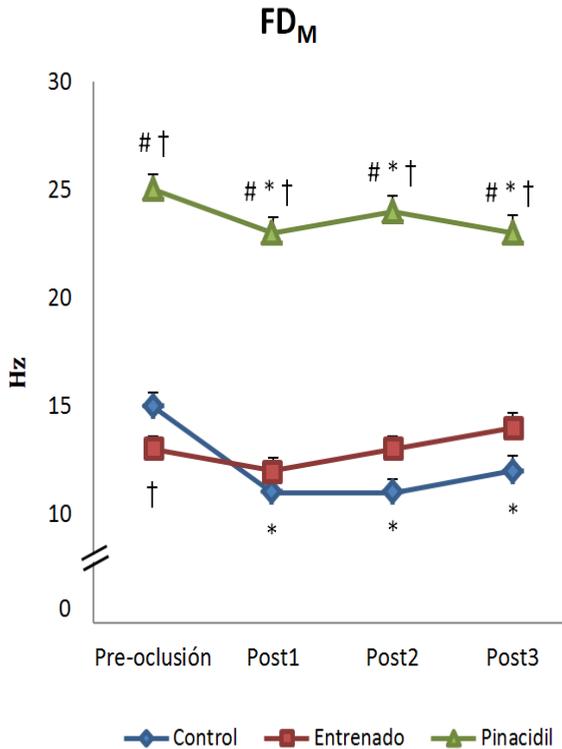


Figura 3.8. Frecuencia dominante media (FD_M), en los grupos control, entrenado y pinacidil, antes de la oclusión (pre-oclusión) y tras 1 minuto (post-1), 2 minutos (post-2) y 3 minutos (post-3) de la oclusión coronaria. Los valores están expresados en Hz. † $p < 0,05$ respecto a grupo control. Grupo control $n = 13$, grupo entrenado $n = 11$ y grupo pinacidil $n = 8$. # $p < 0,05$ respecto a grupo entrenado. * $p < 0,05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras de error corresponden al error típico.

Cuando realizamos una comparación entre grupos en los distintos momentos analizados, después de la oclusión coronaria, no observamos diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo entrenado con el grupo control. Sin embargo, al comparar el valor de la frecuencia dominante media del grupo entrenado frente al grupo control previamente a la oclusión encontramos que este valor fue menor en el grupo entrenado (13 ± 1 vs 15 ± 3 Hz, $p < 0,05$). Cuando comparamos el

3. Resultados.

grupo tratado con pinacidil con los grupos entrenado y control observamos una frecuencia dominante media significativamente más alta, en todos los momentos analizados (Fig. 3.8).

3.5.2. Media de los intervalos VV o intervalos de activación ventricular.

En la figura 3.9 mostramos los resultados referentes a las medias de la longitud del ciclo fibrilatorio determinadas durante la FV, previa y posteriormente a la oclusión coronaria.

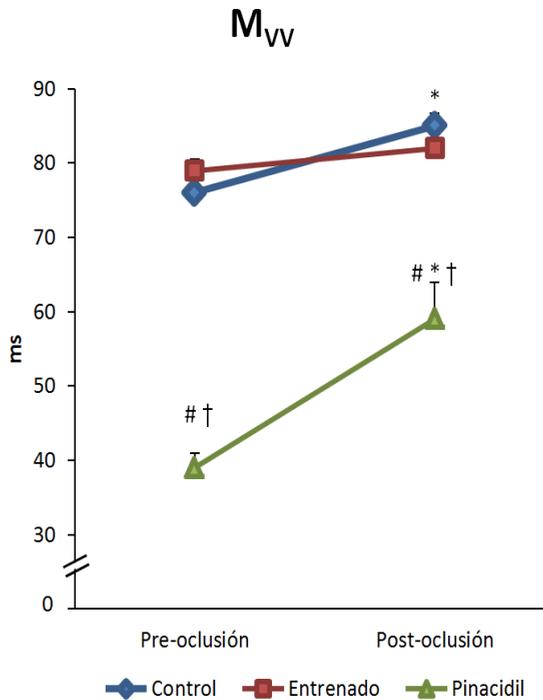


Figura 3.9. Media de los intervalos VV (M_{VV}), en los grupos control, entrenado y pinacidil, antes (pre-oclusión) y tras 5 minutos de la oclusión coronaria (post-oclusión). Los valores están expresados en milisegundos. Grupo control $n = 13$, grupo entrenado $n = 11$ y grupo pinacidil $n = 8$. † $p < 0,05$ respecto a control. # $p < 0,05$ respecto a entrenado. * $p < 0,05$ respecto al valor previo a la oclusión. Las barras de error corresponden al error típico.

Cuando analizamos el efecto de la oclusión coronaria en cada grupo de experimentación, encontramos que en el grupo entrenado no hubo diferencias estadísticamente significativas (78 ± 5 vs 82 ± 9 ms, $p < 0,05$). Sin embargo, se produjo un incremento significativo del referido parámetro tras 5 minutos de oclusión coronaria en el grupo control (76 ± 7 vs 85 ± 6 ms, $p < 0,05$) y en el grupo tratado con pinacidil (39 ± 5 vs 59 ± 24 ms, $p < 0,05$).

Cuando realizamos una comparación entre grupos, observamos que la longitud del ciclo fibrilatorio fue menor en el grupo tratado con pinacidil respecto a los grupos control y entrenado, tanto previamente a la oclusión coronaria, como pasados 5 minutos de la misma.

3.6. Parámetros utilizados para la valoración de la inducibilidad de la fibrilación ventricular (arritmogénesis) y la reversión de la fibrilación ventricular.

3.6.1. Inducibilidad de la fibrilación ventricular.

En la figura 3.10 mostramos los resultados referentes a la capacidad para desencadenar la FV utilizando el TEEV. Como podemos observar de los 8 corazones tratados con pinacidil, 5 entraron en fibrilación ventricular al realizar el TEEV. Sin embargo, no se desencadenó la FV en ningún corazón de los otros dos grupos de estudio, ni en el grupo control, ni en el grupo entrenado.

3. Resultados.

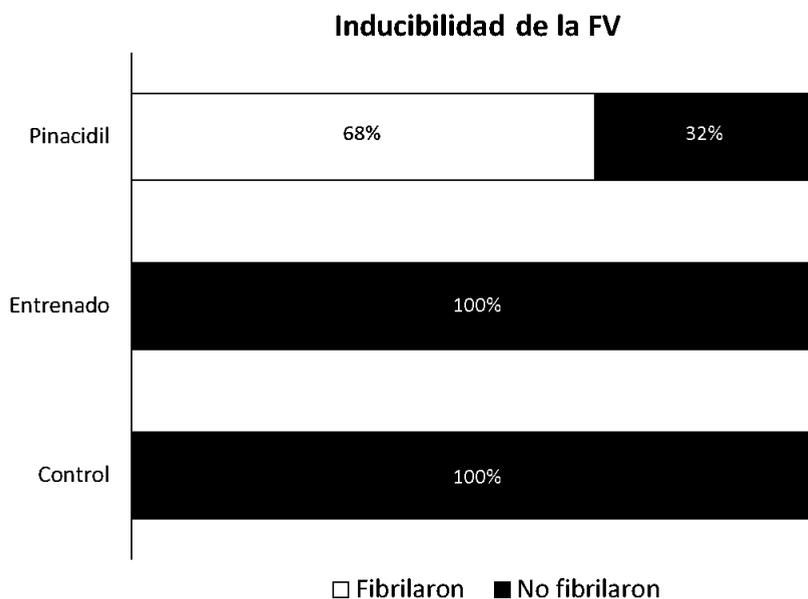


Figura 3.10. Inducibilidad de la fibrilación ventricular a través de la aplicación del test del extraestímulo ventricular (TEEV). Se observa una relación estadísticamente significativa entre el grupo y la inducibilidad de la FV (χ^2 : 20,957; $p < 0,001$).

3.6.2. Reversión de la FV.

En la figura 3.11 podemos observar los resultados referentes a la capacidad para revertir la fibrilación ventricular utilizando un desfibrilador, mediante aplicación de choques de ondas bifásicas con una energía ajustable entre 0,05 y 2,99 julios. En efecto, como podemos observar de los 8 corazones tratados con pinacidil solamente en 1 fue posible revertir la FV. Por otro lado, la reversión de la FV fue posible en todos los corazones del grupo entrenado y en 12 de un total de 13 del grupo control.

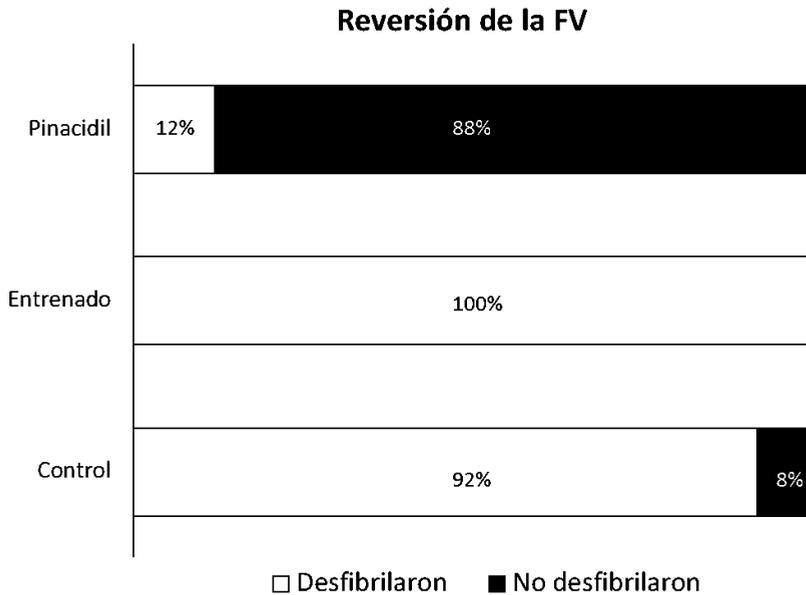


Figura 3.11. Capacidad de reversión de la fibrilación ventricular mediante aplicación de choques de descargas de ondas bifásicas. Observamos una relación estadísticamente significativa entre el grupo y la reversión de la FV (χ^2 : 36,000 $p < 0,001$).

3.6.3. Umbral desfibrilatorio.

En la figura 3.12 están representados los resultados referentes a la media de la energía mínima, en julios, necesaria para desfibrilar los corazones objeto de este estudio tras 5 minutos de oclusión coronaria.

3. Resultados.

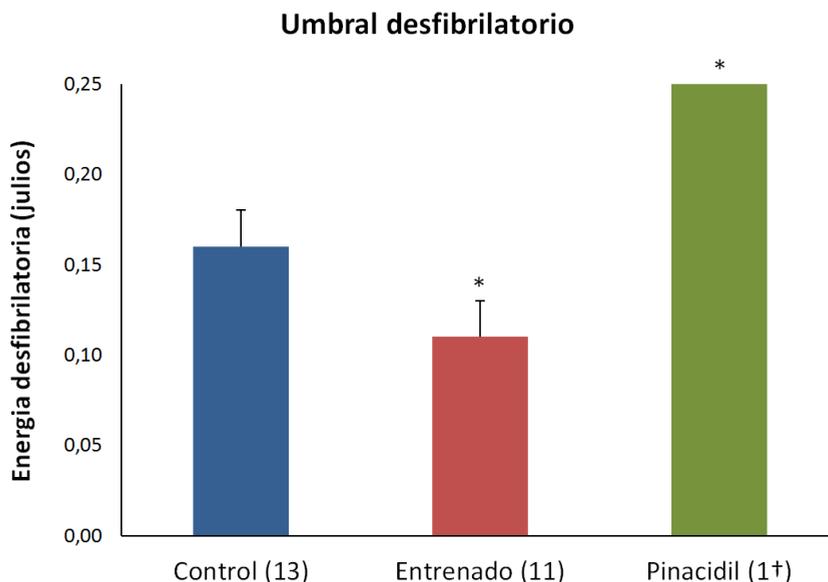


Figura 3.12. Energía mínima necesaria para desfibrilar (umbral desfibrilatorio). Los valores están expresados en julios. † = 1 único experimento en el que fue posible revertir el proceso fibrilatorio de un total de 8. * $p \leq 0,05$ vs control. Número de experimentos entre paréntesis.

Como podemos observar, la energía media necesaria para desfibrilar los corazones en el grupo entrenado fue menor al compararlo con el grupo control ($0,11 \pm 0,02$ vs $0,16 \pm 0,02$ julios, $p < 0,05$). Asimismo, en el único caso en que se pudo revertir la fibrilación en el grupo pinacidil la energía necesaria para desfibrilar fue mayor que la necesaria en los otros dos grupos de estudio (0,25 julios). En los demás corazones del grupo tratado con pinacidil, no se pudo revertir el proceso fibrilatorio, aplicando incluso energía diez veces mayor que la que pudo conseguir la reversión en el grupo entrenado.

4. DISCUSIÓN

4.1. Comentarios sobre la metodología.

4.1.1. Sobre el animal de experimentación.

El animal de experimentación ha sido el conejo de laboratorio, que es un animal relativamente barato y de fácil disponibilidad. Si bien los animales más utilizados en estudios experimentales “in vivo” sobre isquemia y reperfusión miocárdica son ratas, cerdos y perros, los conejos vienen siendo utilizados como un modelo alternativo para el estudio de arritmias producidas como consecuencia de la isquemia y reperfusión. Según Billman (2002) el conejo es considerado como el modelo animal óptimo para estudios similares al desarrollado por nuestro grupo de investigación, ya que es más fácil de inducir y mantener la FV debido al tamaño de su corazón y por el ritmo cardíaco en reposo, que es más lento que animales más pequeños, como la rata o el ratón. El animal usado por nosotros, el conejo de laboratorio, desde hace más de una década exhibió signos cardiovasculares de entrenamiento, manifestados en el corazón aislado, cuando se usó un protocolo similar, en los tiempos y en las series, pero aplicando una velocidad de alrededor de un 30 por ciento superior a la usada en la presente tesis (Such y cols., 2002). Si bien en animales como el cerdo el consumo máximo de oxígeno es similar al de los humanos, con un rango de entre 25 a 55 ml de $O_2/kg \cdot min^{-1}$, presentan inconvenientes como son su capacidad limitada para disipar el calor durante el ejercicio físico por su pobreza en glándulas sudoríparas (para revisión ver Carey, 1997). El perro presenta rango de consumo máximo de oxígeno muy superior al humano, de 53 a 130 ml $O_2/kg \cdot min$ (para revisión ver Carey, 1997). Por otra parte, la manipulación y otras características que hacen más viable la investigación que más adelante

comentaremos, además del objetivo de la propia investigación de la tesis, lo hacen menos idóneo que el conejo de laboratorio.

Idoneidad en relación a los efectos del entrenamiento.

Hemos pretendido investigar qué efectos ejerce el ejercicio crónico de resistencia sobre los parámetros cardiovasculares electrofisiológicos relacionados con la instauración, mantenimiento y cese de la FV. Asimismo como sobre la estabilidad de esta arritmia inducida y sobre parámetros que además informan indirectamente sobre el “estatus” metabólico del miocardio ventricular. Se trata de emular la situación de la persona habitualmente sedentaria y en la que se plantea la realización de un protocolo de ejercicio con carácter presuntamente protector, y como alternativa no farmacológica, frente a la instauración de arritmias reentrantes. Por tanto la especie animal escogida por nosotros exhibe las características de ser sedentaria y manifestar signos electrofisiológicos de entrenamiento con poco tiempo de ejecución del protocolo. El conejo de laboratorio es un animal más bien sedentario y sometido a pocas sesiones de ejercicio físico, incluso no de gran intensidad, presenta signos propios de entrenamiento presentando en el ECG longitudes de ciclo sinusal menores que los animales control tanto “in situ” como en “in vitro” (Such y cols., 2008) así como también signos de carácter bioquímico como son que el incremento en la concentración de lactato en sangre venosa detectada al final de las diferentes series de entrenamiento, al inicio del mismo, ya no se evidenciara al finalizar el proceso de entrenamiento. Por otra parte también se consiguen incrementos de la expresión de proteínas de choque térmico y de óxido nítrico sintasa inducible de miocardio (Such y cols., 2008). Como sabemos el entrenamiento se asocia con un incremento en los niveles relativos de las proteínas de choque térmico HSP40, HSP72 y HSP90 (Hamilton y cols. 2001).

Idoneidad en la manipulación.

Uno de los motivos de habernos decidido por el conejo de laboratorio para, además de someterlo al protocolo de entrenamiento, realizar sobre él las correspondientes manipulaciones quirúrgicas para poner a punto el modelo de corazón aislado, ha sido la posibilidad de realizar estas operaciones con una más que fácil manipulación. Asimismo la perfusión del corazón, tanto en lo que al propio montaje sobre el sistema se refiere, como a la propia perfusión, es que esta se puede realizar con líquidos de fácil disponibilidad y preparación. Esto representa una gran ventaja si lo comparamos con el corazón de animales como el perro, que requiere sangre completa para su perfusión. Si bien la preparación de los medios de perfusión y las características de los mismos son similares a las del modelo aislado y perfundido de conejo, en el caso de los animales más pequeños, la manipulación y las técnicas quirúrgicas en general son algo más farragosas. En el caso de la extracción del corazón de animales más grandes, como es el caso del perro o del cerdo, también el proceso quirúrgico, por otras razones, es más tedioso y el proceso de la extracción, al menos en nuestra experiencia, requiere manipulaciones adicionales para realizar cómodamente el corte de los grandes vasos y la posterior extracción, como la administración de dosis letales de anestésicos y/o la fibrilación ventricular previa.

Idoneidad en cuanto al estudio electrofisiológico.

Igualmente, el conejo representa una clara ventaja respecto a otros animales como el ratón para los estudios de arritmias y fármacos antiarrítmicos. Efectivamente el ratón no es el modelo más adecuado; tiene una masa ventricular pequeña y una frecuencia cardíaca elevada muy superior a la del conejo y la duración del PA es muy corta (Riascos y

4. Discusión.

cols. 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). Asimismo, las características electrofisiológicas del corazón de conejo son muy similares a las del corazón humano (Panfilov, 2006; Gao y cols., 2007; Gaustad y cols., 2010). Aparte de lo ya comentado, el corazón de conejo presenta una circulación colateral prácticamente inexistente, lo cual nos permite poder prescindir de este factor a la hora de interpretar los resultados ya que la circulación colateral influye mucho sobre la respuesta del miocardio a la oclusión coronaria. El hecho de que haya una gran variedad interindividual (como ocurre con algunos animales que presentan dicha circulación coronaria), produce una gran dispersión en los resultados relativos a los parámetros como son el tamaño del infarto y las arritmias.

4.1.2. Sobre el protocolo de entrenamiento.

El presente modelo de protocolo de ejercicio sobre tapiz rodante, ha utilizado el principio de la evitación de una molestia (estímulo eléctrico), que ya en 1951 Miller relató que era mejor que los basados en la recompensa de comida o agua (Miller, 1951). El protocolo de entrenamiento usado por nosotros se diferencia de otros en los que el ejercicio físico era voluntario (Natali y cols., 2002, Stones y cols., 2009).

En líneas generales podemos decir que la mayor parte de los conejos se adaptaron bastante bien al protocolo que se les aplicó, y que ha sido de tipo de aplicación de intervalos de ejercicio en cada sesión, no continuo por tanto usado por diversos autores, además de por nuestro grupo (Meng y Pierce, 1990). Solamente un bajo porcentaje de los mismos fueron desechados desde el principio, en la semana de

adaptación, en relación a los que se adaptaron al protocolo de ejercicio. En este sentido, la “aceptación” del protocolo es similar a lo que indicaron otros autores, que usaron conejos y relataron la buena disposición de los animales a realizar protocolos de carrera a velocidades similares a las que nosotros hemos usado (De Moraes y cols., 2008); aunque debemos señalar discrepancias al respecto (Faris y cols., 1982. Jover y cols., 1987) fundamentadas probablemente en que los conejos no fueron de la misma raza y en otras razones como la diferente tolerancia a la fatiga, y que al parecer no habrían poder seguido nuestro protocolo, dada la velocidad impuesta.

Cuando usamos un protocolo similar, en los tiempos y en las series, pero aplicando una velocidad de alrededor de un 30 por ciento superior a la usada en la presente tesis (Such y cols., 2002), el conejo exhibió signos cardiovasculares de entrenamiento, manifestados en el corazón aislado, por una mayor longitud del ciclo sinusal que los animales del grupo control, y asimismo una conducción auriculoventricular más deprimida, manifestada por una menor longitud del ciclo de Wenkebach en los corazones procedentes de los animales entrenados. Con la aplicación del protocolo usado en la presente tesis, nosotros publicamos una mayor longitud del ciclo sinusal tanto “in vivo” como “in vitro”, signos estos de efectividad del protocolo de entrenamiento. Hemos publicado que la aplicación del protocolo propio de la presente tesis produce signos electrocardiográficos y metabólicos de entrenamiento (Such y cols., 2008) y que en líneas anteriores hemos comentado en relación de la idoneidad de los efectos del entrenamiento.

4.1.3. Sobre el estudio electrofisiológico.

Como hemos señalado en estudios previos (Such-Miquel, 2005), el análisis de la activación ventricular durante la FV es complejo debido a las características de la arritmia y a las limitaciones de las técnicas utilizadas para su estudio, que ha sido abordado utilizando métodos y técnicas diversas (para revisión ver Such-Miquel, 2005), entre los que se encuentran el análisis de las características del ECG, registros endocárdicos, intracelulares o de los potenciales de acción monofásicos, el análisis de las características espectrales de las señales fibrilatorias, los estudios basados en técnicas cartográficas y la utilización de simulaciones mediante ordenador.

La cartografía epicárdica de la activación ventricular usada por nosotros en la presente tesis doctoral, empleando electrodos múltiples con los que se registran potenciales extracelulares (Rogers y cols., 1999, Brugada y cols., 1990) indican los cambios del potencial transmembrana de grupos de células próximas entre sí (Witkowski y cols., 1998, Efimov y cols., 1999), y aporta información sobre las características de la activación miocárdica durante las arritmias ventriculares y han supuesto el soporte metodológico de diversos trabajos sobre la FV en los que se han objetivado los patrones de activación y la existencia de activación reentrante tanto en el inicio de la arritmia como durante la evolución de la misma (Rogers y cols., 1999, Chorro y cols., 2000, Witkowski y cols., 1998). Otros estudios se han basado en técnicas cartográficas que permiten la obtención de información tanto espacial como temporal, sobre la activación miocárdica durante las arritmias ventriculares. Mediante este método, se identifican los momentos de activación en diferentes lugares explorados pudiéndose construir líneas isócronas. También se pueden construir mapas isopotenciales, esto es, que

muestran las zonas con idéntica amplitud de los voltajes en un momento determinado y por tanto, las variaciones de los mismos a lo largo del tiempo. Estos procedimientos, suponen el registro de electrogramas obtenidos con electrodos múltiples epicárdicos, endocárdicos y/o intramiocárdicos, habiendo sido usados por múltiples autores como son Rogers y cols. (1999), Brugada y cols. (1990), Rankovic y cols. (1999), autores estos citados por Cánoves (2001). El análisis de los parámetros electrofisiológicos obtenidos en la presente tesis ha sido posible fundamentalmente, gracias al uso de métodos de cartografía epicárdica que nos ha facilitado la extracción de datos, tras el procesamiento de los electrogramas ventriculares durante la fibrilación, en el dominio del tiempo.

Los métodos basados en el análisis del dominio de la frecuencia, también usados en este trabajo de investigación, examinan la distribución de la energía de los electrogramas como una función de la frecuencia (Ropella 2001). Para el análisis espectral puede ser usado un método matemático como es el de la transformación rápida de Fourier; el análisis de Fourier es un método no paramétrico que descompone las señales en una suma de componentes sinusoidales. La utilización de técnicas situadas en el dominio de la frecuencia ha ampliado la capacidad de análisis de las ondas fibrilatorias obtenidas con el ECG de superficie o mediante electrodos epi o endocárdicos. En el espectro de frecuencias los componentes principales de las señales fibrilatorias se agrupan en bandas alrededor de valores definidos que se pueden identificar con facilidad y permiten caracterizar mejor las fases evolutivas de la arritmia. La información proporcionada por las técnicas espectrales y la obtenida mediante la determinación de parámetros en el dominio del tiempo como la media, mediana y percentil 5 de los intervalos VV durante la FV,

4. Discusión.

proporciona información superponible (Chorro y cols., 2000) y son instrumentos útiles para caracterizar las acciones de fármacos u otros procedimientos terapéuticos. Varias son las características del poder espectral que han sido analizadas en la fibrilación ventricular con el fin de establecer su carácter predictivo en relación con las consecuencias de la misma tras la desfibrilación.

4.2. Sobre los resultados.

4.2.1. Comentarios generales.

Como ha sido relatado en el capítulo de introducción, el ejercicio físico aeróbico produce modificaciones electrofisiológicas que van desde las clásicamente conocidas (Scheuer y Tipton, 1977, Such y cols., 2002 y Billman y cols., 2015) que afectan al cronotropismo del nodo sinusal (disminución de la frecuencia cardíaca en reposo y con ejercicios submáximos, en relación a los individuos sedentarios) y a la conducción en el nodo auriculoventricular (alargamiento del tiempo de conducción en este territorio, e incluso bloqueos auriculoventriculares), hasta las modificaciones electrofisiológicas más recientemente estudiadas en relación con la refractariedad y otras propiedades, como la heterogeneidad, velocidad de conducción y longitud de onda del proceso de activación eléctrica del miocardio; todas ellas ligadas a la instauración de arritmias reentrantes y a la arritmogénesis en general (Hajnal y cols., 2005, Such y cols., 2008, Billman, 2009). En la actualidad han sido estudiados también alguno de los mecanismos básicos que están implicados en las modificaciones electrofisiológicas a las que acabamos de hacer alusión, de las que resaltamos las relacionadas con el aumento de la duración del potencial de acción, en situación de normoxia, y por

tanto de la refractariedad, por efecto del entrenamiento (Gwathmey y cols., 1990; Natali y cols., 2002; Yang y cols., 2010).

4.2.2. Relativos a la refractariedad.

En relación a este parámetro comentamos a continuación los resultados sobre el mismo, tanto cuando nos referimos al mismo, determinado como el percentil cinco de los intervalos entre los trazados de activación determinados durante la FV, como cuando expresamos la frecuencia de la arritmia como medida indirecta de la refractariedad.

La refractariedad miocárdica junto con la velocidad de conducción, que determina la longitud de onda del proceso de activación miocárdico es un factor relacionado con la aparición y la estabilización de arritmias reentrantes respecto al tiempo (Wijffels y cols., 1995). El mayor periodo refractario de los animales entrenados es, en principio, un efecto protector frente a las alteraciones electrofisiológicas, pudiendo participar como un mecanismo básico por el que la realización de ejercicio físico aeróbico ejerce un efecto protector frente a las arritmias reentrantes que producen la muerte súbita, y puede constituir parte de la base por la que el ejercicio físico se ha propuesto como una intervención frente a las arritmias, de carácter no farmacológica (Billman, 2002).

Aunque no se ha investigado en la presente tesis ningún mecanismo básico por los que la aplicación del protocolo de ejercicio ha aumentado la refractariedad, exponemos a continuación investigaciones previas cuyos resultados son interesantes a tener en cuenta por la posible implicación, en unos casos, o por el contrario, la falta de implicación, de una serie de mecanismos básicos potencialmente participantes en nuestros resultados. El entrenamiento físico, se ha demostrado por muchos investigadores, usando diversas metodologías experimentales,

4. Discusión.

que incrementa la duración del potencial de acción (Gwathmey y cols., 1990, Mokolke y cols., 1997, Natali y cols., 2002). Como sabemos el aumento de la duración del potencial de acción, en circunstancias de normal perfusión miocárdica, corre paralela a la refractariedad (Wu y cols., 2006). De hecho trabajos posteriores de investigación experimental han publicado, de modo similar a lo acontecido con la duración del potencial de acción, un incremento de la refractariedad ventricular como uno de los resultados del ejercicio físico crónico aeróbico (Such y cols., 2008, Zarzoso y cols., 2012). Este incremento de la refractariedad se ha publicado que ocurre en atletas, en otros territorios miocárdicos, que no son el ventricular (Stein y cols., 2002). Además en las investigaciones animales que acabamos de comentar la variación por el ejercicio físico se ha manifestado en el corazón aislado y por tanto no sometido a influencias nerviosas centrales ni humorales, o en la situación de los atletas, se ha manifestado en el corazón tras bloqueo del sistema nervioso autónomo.

Entre los mecanismos que podrían estar implicados en los resultados que presentamos, y que si bien no han sido investigados por nosotros, sí que podrían encontrar respuesta en investigaciones realizadas por otros autores. Así, Jew y cols. (2001) encontraron en cardiomiocitos aislados de ventrículo izquierdo de ratas sometidas a entrenamiento en carrera, y utilizando la técnica de patch-clamp, que el entrenamiento produjo una reducción en la densidad de corrientes repolarizantes de potasio de inactivación lenta o sostenida. Contrariamente Yang y cols. (2010) encontraron que la hipertrofia miocárdica fisiológica debida al ejercicio físico, en ratones entrenados con natación, se acompañó de una regulación paralela, al alza, de los canales repolarizantes de potasio. Por otra parte las investigaciones

llevadas a cabo para conocer la posible participación de las modificaciones de la corriente lenta de entrada de calcio (I_{Ca-L}), responsable de la meseta del potencial de acción del cardiomiocito ventricular, en las modificaciones de dicho potencial no parecieron indicar variación alguna de dicha corriente, por el ejercicio crónico (Mokelke y cols., 1997). No obstante, algo más de una década más tarde Yang y cols. (2010, 2012) encontraron en los ratones entrenados, haciéndoles nadar, un aumento de la expresión de transcritos codificantes de los canales de Ca^{2+} y de potasio y de otros canales, en paralelo con el aumento del tamaño de los miocitos. Jew y cols. (2001) en ratas entrenadas en carrera encontraron en los cardiomiocitos ventriculares un aumento en la pendiente para alcanzar el pico de la corriente transitoria de potasio, I_{to} , y un incremento de la densidad de la citada corriente; paradójicamente, más tarde Stones y cols. (2009) en ratas sometidas a ejercicio voluntario hallaron una disminución de la corriente I_{to} , que atribuyeron a una cantidad menor de canales funcionales en los cardiomiocitos ventriculares subepicárdicos.

En relación a la corriente I_{Na-L} , implicada en la duración del potencial de acción y por tanto de la refractariedad, queremos enfatizar que no hemos encontrado ninguna información en relación a su posible participación en las modificaciones electrofisiológicas por el entrenamiento. En relación a esta corriente diremos que se sabe desde hace décadas que la tetrodotoxina (bloqueante de los canales de sodio) reduce la duración de la meseta del potencial de acción de la célula muscular cardíaca (Attwell y cols., 1979; Callewaert y cols., 1984, citados por Saint y cols., 1992). También se encontraron, usando *patch clamp* en membrana de músculo cardíaco, que había algunas aperturas "tardías" y "ultra-lentas" de los canales de sodio (Patlak y Ortiz, 1985; Kunze y cols.,

4. Discusión.

1985, citados por Saint y cols., 1992) y estas fueron consideradas como responsables de la corriente de sodio que contribuye a la fase de meseta del potencial de acción. Usando técnicas de fijación de voltaje con sellado hermético de células enteras, con el fin de registrar las corrientes iónicas en cardiomiocitos de rata adulta aislados, y sustrayendo las corrientes registradas en presencia y ausencia de tetrodotoxina, se reveló la existencia de una pequeña corriente, persistente, hacia el interior que seguía a otra mucho mayor, transitoria, y hacia el interior celular (Saint y cols., 1992). Así pues esta corriente está implicada en la duración del potencial de acción de los cardiomiocitos siendo un determinante de la misma (para revisión ver Guasch y Mont, 2010) y circunstancias como la hipoxia incrementan la corriente persistente (Ju y cols., 1996, para revisión ver Tamargo y cols., 2010). El hecho de que la mencionada corriente participe en el alargamiento en el tiempo del potencial de acción, es razonable que plantee si el alargamiento del mismo, y por ende de la refractariedad está relacionada con la modificación de la corriente tardía o persistente de sodio por el ejercicio; pero como hemos señalado, a día de hoy, no hemos encontrado ninguna referencia que aluda a la posibilidad citada.

Como hemos visto en el capítulo de resultados la administración de pinacidil acortó el periodo refractario (determinado con la aplicación del test del extraestímulo), previamente a la oclusión arterial coronaria. En relación al acortamiento de la refractariedad producida por la administración de pinacidil, se sabe desde hace tiempo, tal y como relató Ferrero (2005) en su revisión al respecto, que la activación de la corriente $I_{K_{ATP}}$ acorta la duración del potencial de acción cardíaco, reduce la entrada de calcio, preserva los niveles de ATP (ahorrando energía) e incrementa la supervivencia celular durante la isquemia

miocárdica (ver revisiones de Powers y cols., 2008 y Li y Dong, 2010). La activación de dicha corriente, por la administración de pinacidil, da como resultado una reducción de la DPA y del PR (Wilde y cols., 1994) sin afectar a la velocidad de conducción (Smallwood y Steinberg, 1988, Uchida y cols., 1999, citados por Ferrero, 2005), produciendo también una tendencia a la hiperpolarización, disminuyendo la excitabilidad celular, en principio. Nuestros resultados son coincidentes con algunas de las observaciones citadas.

El incremento del periodo refractario tras la oclusión arterial coronaria, que ocurrió en el grupo control, lo interpretamos como un signo de deterioro. Si bien 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 para manifestar el deterioro morfofuncional del tejido. Por ello, el mantenimiento de la refractariedad en el grupo entrenado, como luego veremos, lo interpretamos como un efecto beneficioso del ejercicio físico crónico. Efectivamente Strohmenger y cols. (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; Neumar y cols., 1990; Hillsley y cols. 1994; citados por Strohmenger y cols., 1997), también se manifestaba por una caída de la frecuencia de la fibrilación ventricular. Por tanto, podemos dar una consideración de efecto deletéreo al decremento de la frecuencia de la FV coincidente con un deterioro metabólico (Neumar y cols., 1990).

4. Discusión.

En el grupo tratado con pinacidil, hemos visto que en el caso de la isquemia aguda, por una parte el periodo refractario funcional (ahora determinado durante la FV) fue menor en el grupo tratado con pinacidil que en los grupos control y entrenado. El pinacidil ejercería un efecto proarrítmico en estas circunstancias. Siguiendo la revisión de Ferrero antes mencionada encontramos que los resultados experimentales con modelos de isquemia y reperfusión en animales han sido contradictorios. Así hay autores que en experimentos en perros con infartos crónicos de miocardio y sometidos a oclusión coronaria aguda, observaron un aumento de la incidencia de fibrilación ventricular por el pinacidil (Chi L y cols., 1990). Uchida y cols. (1999) en tejido epicárdico de perros encontraron que el cromakalin, agonista de los canales K_{ATP} , aumentaba la ventana vulnerable. Grover y cols. (1990), sin embargo, no encontraron efecto proarrítmico inducido por el pinacidil. En corazón de cerdo sometido a isquemia aguda; y D'Alonzo y cols. (1994b) encontraron que el pinacidil tenía efecto antifibrilatorio. En otras especies como en el conejo y la rata, los resultados fueron igualmente contradictorios, en cambio en un modelo "in vivo" de isquemia en ratas se encontró que el pinacidil hizo más fácilmente inducible la FV (Lu y cols., 1993) por otra parte, D'Alonzo y cols. (1994a) obtienen como resultado un efecto antiarrítmico del mismo.

Si bien las alteraciones electrofisiológicas que más predisponen a la reentrada son la reducción de la VC y las heterogeneidades en la excitabilidad producidas principalmente por las heterogeneidades en la concentración extracelular de K^+ y en la duración del potencial de acción, las disminuciones de la refractariedad, y por supuesto la dispersión de esta propiedad por el miocardio, son también un factor claramente arritmogénico, y en este sentido la apertura del canal K_{ATP} , en nuestra

investigación, ha modificado el comportamiento electrofisiológico del miocardio ventricular, en una dirección pro-arritmogénica; y no solamente en la situación de isquemia regional, sino también en el corazón aislado y nutrido con una perfusión normalmente oxigenada.

Hay que decir que si bien el valor del periodo refractario en el grupo tratado con pinacidil, alargado tras la oclusión coronaria aguda, fue menor que en los demás grupos, dicho parámetro sufrió también un incremento en la situación citada, en relación con la situación basal para este grupo. Esto, que ocurrió también en el grupo control, como en su momento indicamos, lo interpretamos como signo de deterioro miocárdico.

En el grupo entrenado, el periodo refractario funcional, medido durante la fibrilación ventricular, se mantuvo sin cambios durante la isquemia aguda. Son ya clásicas las evidencias de efectos metabólicos del entrenamiento que podrían explicar la acción protectora del mismo. Como relataron Scheuer y Tipton (1977), en una clásica revisión al respecto, hay pruebas de que la cantidad de glucógeno en el músculo esquelético puede ser un factor limitante en la resistencia muscular y el desarrollo de la fatiga y en corazones de roedores entrenados físicamente se ha demostrado que han aumentado las reservas de glucógeno en reposo, estando la actividad sintetasa de glucógeno aumentada en los corazones de cobayas entrenados. Estos altos niveles cardíacos de glucógeno pueden conferir una mayor reserva de sustrato para la actividad cardíaca durante el esfuerzo y ser una buena fuente de sustrato metabólico-energético durante circunstancias como la isquemia aguda (Carmeliet 1999). El ejercicio aeróbico aumenta la capacidad de los intermediarios metabólicos de miocardio canino incrementando selectivamente las concentraciones de enzimas reguladoras del

4. Discusión.

metabolismo de la glucólisis y del metabolismo oxidativo (Stuewe y cols., 2000). Es por tanto bien conocido que los animales entrenados exhiben mayor reserva de glucógeno en reposo (para revisión ver Powers y cols. 2008), y glicolisis anaeróbica, que comienza y se intensifica en la isquemia miocárdica, y ello contribuye como medio eficaz para mantener los niveles de ATP en las primeras fases de este proceso (Carmeliet 1999).

Las razones metabólicas arriba indicadas se suman a otros mecanismo que han sido implicados en los efectos protectores del ejercicio físico crónico. Estos incluyen cambios fisiológicos y anatómicos en las arterias coronarias (Laughlin y cols., 2012), inducción de la síntesis de proteínas de choque térmico (Such y cols., 2008), aumento de la reserva antioxidante (Frasier y cols., 2013), a los niveles aumentados de ciclooxigenasa (Bolli, 2006), y a la función aumentada de los canales de potasio sensibles a ATP del sarcolema (Brown y cols., 2005, Zingman y cols., 2011, para revisión ver Powers y cols. 2014).

De todos estos últimos mecanismos propuestos, es el que hemos citado en último lugar el directamente relacionado con la presente tesis. Y precisamente nuestros resultados parecen poner en cuestión este mecanismo altamente reivindicado como mediador del efecto protector del ejercicio físico crónico. Nuestros resultados en lo tocante a los parámetros de refractariedad tras la isquemia regional aguda, en los grupos entrenado y tratado con pinacidil, nos llevan a pensar en que si bien lo que interpretamos como signo de deterioro tras la isquemia, es el incremento de la refractariedad media de la zona explorada, no parece haberse contrarrestado respecto a la situación basal, por el hecho de abrir el canal con el fármaco objeto de estudio, además del propio efecto de la isquemia, contrariamente a lo que ha ocurrido con el grupo entrenado. Así pues, esto parece cuestionar, al menos en parte, la

apertura del canal a uno de los mecanismos que se postulan como base de los efectos beneficiosos del ejercicio físico crónico y que hemos comentado en el capítulo de introducción y no parece que en este sentido el ejercicio físico haya operado de modo similar a como lo ha hecho la apertura del canal K_{ATP} , sino más bien al contrario. Este es pues un aspecto a tener en cuenta y que requiere especial consideración y contrastes.

En relación a los resultados obtenidos en lo que respecta al análisis espectral de la FV, es decir, el estudio de la frecuencia dominante, como parámetro relacionado con la refractariedad, los resultados se hallan en consonancia con lo ocurrido para la refractariedad. La frecuencia de la fibrilación, como acabamos de comentar se corresponde y se modifica de modo paralelo a la refractariedad miocárdica (Chorro y cols., 2000a).

En cuanto a la menor frecuencia de la fibrilación en el grupo entrenado, previamente a la oclusión coronaria, está en relación con la mayor refractariedad que produce el entrenamiento y que ha sido comentada en líneas anteriores. La mayor frecuencia de la fibrilación en el grupo tratado con pinacidil respecto a los grupos control y tratado, se corresponde efectivamente con el decremento del periodo refractario comentado en líneas anteriores y cuyas bases electrofisiológicas también han sido abordadas. De modo similar a lo que ocurrió con el periodo refractario tras la oclusión en el grupo control y en el tratado con pinacidil, se produjo una disminución de la FV.

La disminución de la frecuencia de la fibrilación tras la oclusión arterial coronaria, que ocurrió en el grupo control, lo interpretamos como un signo de deterioro, como así lo hicimos con el incremento de la refractariedad post oclusión coronaria.

4. Discusión.

Pese a que la frecuencia de la FV, tras la oclusión coronaria, fue mayor en el grupo tratado con pinacidil que en el control, éste parámetro, como ha sido comentado, también disminuyó en relación con su valor basal. Es por ello que aquí se podrían aplicar las mismas consideraciones que acabamos de hacer para el grupo control.

En el grupo entrenado, la oclusión coronaria mantuvo la frecuencia de la FV en valores similares a los basales, durante los momentos más prematuros de la isquemia. De modo similar, estudios previos realizados por nosotros evidenciaron una caída de la frecuencia dominante de la fibrilación tras la oclusión coronaria, que fue preservada por el entrenamiento (Such-Miquel, 2007).

La discrepancia entre los resultados obtenidos en este parámetro, entre el grupo entrenado y el tratado con pinacidil, tras la oclusión arterial coronaria, pone en duda, al igual que comentamos para el caso de la refractariedad, que la apertura del canal K_{ATP} , sea uno de los mecanismos que se postulan como base de los efectos beneficiosos del ejercicio físico crónico, no pareciendo que el ejercicio físico haya operado de modo similar a como lo ha hecho la apertura del canal K_{ATP} , sino, como también antes hemos comentado, más bien al contrario.

4.2.3. Relativos a la heterogeneidad electrofisiológica.

Aunque no en todos los parámetros de heterogeneidad electrofisiológica, si en algunos como el CV de la frecuencia dominante de la FV y el de los intervalos VV, se manifestó el grupo entrenado con un miocardio ventricular menos heterogéneo electrofisiológicamente que el control, lo que es un efecto claramente beneficioso del ejercicio físico crónico. El miocardio es un sincitio funcional, pero no es absolutamente homogéneo desde el punto de vista electrofisiológico, que si bien lo es

ostensiblemente menos en situaciones patológicas, como es el caso de la isquemia, en condiciones normales existe una cierta 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. Una cierta heterogeneidad es inherente al tejido cardíaco (expresión y función de los canales iónicos, conexiones intercelulares, estructura tisular). Una mayor heterogeneidad es responsable de la aparición de bloqueos en la conducción, dispersión espacial de la repolarización etc. (Kléber y Rudy, 2004) lo que a su vez facilita la aparición del fenómeno de la re-entrada y las arritmias dependientes.

Desconocemos el mecanismo por el cual el entrenamiento físico puede operar sobre este parámetro de heterogeneidad fisiológica del miocardio. En algunos animales, como en el caso del perro, se han encontrado diferencias en lo que a refractariedad se refiere, a frecuencias cardíacas normales, de aproximadamente 40 ms (Janse y cols., 1969; Janse, 1971, citados por Kléber y 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 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, y quizás a las mismas propiedades de las membranas como cable entre otros, y que tal vez, aunque sea un planteamiento especulativo, el entrenamiento los ha modificado de modo homogéneo y asimismo aquellas propiedades que se asientan sobre estos mecanismos como son la refractariedad y la velocidad de conducción.

Un resultado espacialmente interesante en relación al fundamental objetivo del presente trabajo ha sido que los parámetros de heterogeneidad tras la oclusión arterial coronaria han sido mayores en el

4. Discusión.

grupo tratado con el abridor del canal K_{ATP} pinacidil, que los correspondientes a los grupos control y entrenado. Dos consideraciones son especialmente resaltables: por una parte, el comportamiento de la apertura del mencionado canal no ha hecho que los corazones tratados exhibieran la misma heterogeneidad que los corazones procedentes de los animales entrenados, lo que obliga a cuestionar o a buscar explicaciones para mantener la idea de que el ejercicio físico ejerce su efecto protector en la isquemia aguda, a través de una mayor actividad de la corriente vehiculada por los canales K_{ATP} . Otra cuestión, aunque de menor relevancia por lo conocida, es que la mayor heterogeneidad eléctrica es un factor fundamental en la aparición y perpetuación de las arritmias por re-entrada (para revisión ver Jalife, 2000). Son ya clásicas las investigaciones de Han y Moe (1964), en las que se estableció la importancia de la heterogeneidad en el período refractario para la inducción de fibrilación ventricular. De hecho Moe y Abildskov (1959) demostraron que la fibrilación auricular podía persistir con una serie de características pero solamente si existía una dispersión de la repolarización. Por tanto si bien en el miocardio ventricular la heterogeneidad electrofisiológica es menor en el corazón procedente de un animal entrenado, y por tanto es menos sensible a las arritmias re-entrantes, en el miocardio sometido a oclusión coronaria aguda, la apertura de los canales K_{ATP} ejerce un efecto pro-arritmogénico.

4.2.4. Sobre la arritmogénesis y la reversión de la fibrilación ventricular.

Los resultados correspondientes a los experimentos en los que se ha administrado pinacidil vienen a perfilar la participación del canal K_{ATP} en los efectos del entrenamiento físico sobre el miocardio isquémico. En trabajos previos, el bloqueo del mencionado canal exhibió efectos

beneficiosos de carácter anti arritmogénico, como son una disminución de la energía necesaria para revertir la fibrilación ventricular mediante la aplicación de choques eléctricos de ondas bifásicas (del Canto y cols., 2014), y una aparente disminución de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio (Parra y cols., 2011, 2012).

Finalmente en lo que respecta a las posibles similitudes entre el grupo entrenado y el tratado con pinacidil, desde el punto de vista de la actividad antiarrítmica, como ya vimos en el capítulo de resultados, la inducibilidad de la fibrilación ventricular durante la aplicación del test del extraestímulo ha sido la norma en casi todos los experimentos del grupo tratado con pinacidil; en cambio ni en el grupo control, ni por supuesto en el entrenado, se consiguió inducir la fibrilación ventricular con el test antes mencionado. Después de la oclusión coronaria, la reversión de la fibrilación no se consiguió en casi ningún corazón del grupo tratado con pinacidil, habiendo una insalvable diferencia entre este grupo y el grupo entrenado. Una vez más, pues, el grupo tratado con pinacidil, no es solamente que no se comporta igual que el grupo entrenado sino que se comporta de modo radicalmente diferente al grupo entrenado. Por tanto las modificaciones que se producen en uno y otro grupo sobre las propiedades en las que se asienta la facilidad para fibrilar y la facilidad para la reversión del proceso fibrilatorio, cabe pensar que siguen sentidos opuestos.

Nuestros resultados en relación a la energía necesaria para desfibrilar podrían estar relacionados, en parte, con los efectos beneficiosos del ejercicio crónico sobre la heterogeneidad del miocardio, que se muestra en el presente estudio. Efectivamente, se ha propuesto que la desfibrilación exitosa está relacionada con la capacidad de los choques eléctricos para prolongar, sincronizar y disminuir la dispersión

4. Discusión.

de la repolarización (Dillon 1992, Knisley y cols., 1992). El papel de las heterogeneidades ventriculares transmurales en la vulnerabilidad cardíaca a descargas eléctricas se ha publicado hace relativamente poco tiempo (Maharaj y cols., 2008).

4.3. Limitaciones del estudio.

Salvo para el caso de la determinación del periodo refractario mediante la aplicación del test del extraestímulo, cuando el corazón aislado se halla en ritmo sinusal, el resto de las determinaciones electrofisiológicas lo han sido a partir del corazón sometido a fibrilación ventricular sin interrumpir la perfusión global. Comoquiera que el proceso de la FV supone la instauración de un proceso en un medio tridimensional, el hecho de que registrara con un electrodo múltiple de superficie, implica que se tenga una información epicárdica bidimensional, con una importante exclusión de las capas mesocárdicas y endocárdicas.

El marcado de las ondas de activación para el análisis de la FV en el dominio del tiempo y a través del mismo determinar el periodo refractario funcional (percentil cinco de los intervalos VV) y la media de los intervalos VV, como parámetro que indirectamente nos informa de la refractariedad ventricular y que también nos servirá para tener información de la heterogeneidad, el marcado de estas ondas, decíamos, se realiza habitualmente mediante una metodología semiautomática basada en un proceso de identificación de la pendiente máxima negativa (dv/dt). Si bien en la presente tesis ha sido utilizado un método de detección de las zonas de marcado, este no está desarrollado totalmente y se ha de acompañar de una supervisión de las señales por parte del investigador, lo que sigue dándole un cierto grado de subjetividad al

método. Por otra parte el hecho de 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, es la causa de que en algunos electrodos no se obtengan las señales con el grado de “fidelidad” que sería deseable. Pese a ello 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 (Chorro y cols., 2000b, 2000c, 2002, 2003, Pelechano, 2008, Trapero y cols., 2008).

En el caso del parámetro frecuencia dominante de la fibrilación ventricular, estimamos que el método usado para el análisis espectral, ofrece datos no fiables a los cinco minutos de oclusión arterial coronaria, a la vista de la evolución paradójica de los mismos y al contrastar este análisis con el realizado en el dominio del tiempo. Esta cuestión ha sido planteada como una limitación. Esto nos obliga a revisar la metodología empleada para la realización del análisis espectral y modificar criterios del programa empleado.

Otra cuestión a tener en cuenta es que hemos usado pinacidil como abridor del canal K_{ATP} del sarcolema; pero hay que tener también en cuenta que este fármaco no es específico del canal del sarcolema, sino que también tiene acción sobre la mitocondria. Es por ello que lo que procede es la continuación de estos estudios pero con el uso de abridores específicos del canal K_{ATP} del sarcolema.

El hecho de trabajar con un corazón aislado y perfundido desconectado de influencias nerviosas y/o humorales aleja algo el comportamiento de este órgano de la fisiología normal, ya que además no ejerce trabajo contra una poscarga y solamente contra una ligerísima precarga debida al fluido nutricio que discurre por la circulación

4. Discusión.

coronaria y que tras desembocar en la aurícula derecha pasa al ventrículo derecho a través del cual pasa a la arteria pulmonar y de ésta, dado que está seccionada, el fluido nuticio es vertido al exterior.

Finalmente, no puede pasar por alto que el estudio se ha realizado en un corazón de conejo y no humano, con lo que obliga a interpretar los resultados de cara al ser humano con prudencia.

4.4. Comentarios finales.

Como antes hemos comentado, la caída de la frecuencia de la fibrilación en situación de isquemia, que ocurrió en el grupo tratado con pinacidil, es un signo de deterioro del “estatus” metabólico del miocardio, y que no ocurrió en el corazón procedente de conejos entrenados. Por tanto esta diferencia de comportamiento entre el corazón del animal sometido a ejercicio físico crónico y el sometido a la apertura del canal K_{ATP} contrasta con la similitud entre corazones entrenados y los tratados en otro grupo de experimentos en el que se usó un fármaco bloqueante de los canales K_{ATP} .

Estas consideraciones nos han llevado a cuestionar el incremento de la corriente de potasio vehiculada por los canales K_{ATP} como mecanismo básico del efecto beneficioso del ejercicio físico crónico cuando investigamos los parámetros relacionados con la instauración de arritmias y sobre la estabilidad de la FV.

Aceptar que el ejercicio físico crónico protege durante la isquemia aguda a través de la apertura del canal K_{ATP} nos lleva a la pregunta: ¿cómo interpretar que el ejercicio físico con probada actividad antiarrítmica, actúa mediante la apertura de este canal, situación ésta que en nuestra tesis hemos visto que se ha comportado como arritmogénica, no solamente tras la isquemia aguda, sino también en el

corazón sometido a perfusión normalmente oxigenada? A esta pregunta podríamos responder con el siguiente razonamiento: si el ejercicio físico crónico disminuye la magnitud de la lesión miocárdica debida a la isquemia aguda, esto podría repercutir también sobre la producción de arritmias tal y como señaló algún que otro autor (Shigematsu y cols., 1995). Esto podría darnos la respuesta de modo inapelable de no ser que tengamos en cuenta las consideraciones realizadas en una revisión al respecto y en la que parece indicar que el razonamiento esgrimido es más bien poco compartido (Flagg y cols., 2010). En dicha revisión se describe “La mayoría de los estudios, pero no todos, indican que la activación farmacológica de K_{ATP} promueve taquicardia y fibrilación ventricular, mientras su bloqueo durante la isquemia-reperfusión generalmente disminuyen la incidencia de taquicardia sostenida y fibrilación ventricular, pero de nuevo no en todos los estudios. Por lo tanto los tratamientos farmacológicos utilizados para desentrañar los efectos de los canales K_{ATP} en el ritmo cardíaco han arrojado resultados equívocos, pero en general, la activación K_{ATP} probablemente debería considerarse proarrítmica en el contexto de la isquemia” (Flagg y cols., 2010) .

5. CONCLUSIONES

Hemos realizado un estudio, en corazón aislado y perfundido de conejo, con el fin de comparar los efectos electrofisiológicos intrínsecos producidos por el ejercicio físico crónico con los producidos por la apertura del canal K_{ATP} sarcolémico con pinacidil, tanto en circunstancias de perfusión cardíaca global oxigenada y tras isquemia regional aguda, con el fin de contribuir a dilucidar el papel del mencionado canal en los efectos protectores del entrenamiento físico, dada la idea generalizada de que este opera beneficiosamente a través de la apertura del mencionado canal y las observaciones electrofisiológicas realizadas por nosotros que no parecen apuntar en esa dirección; al menos en lo que a determinados parámetros electrofisiológicos se refiere. La mayor parte de los parámetros han sido estudiados en el corazón aislado sometido a fibrilación ventricular, sin interrumpir la perfusión global del mismo.

De los resultados obtenidos en nuestro modelo de corazón aislado de conejo y sometido a perfusión normalmente oxigenada, podemos concluir que:

1. En condiciones de oxigenación global del corazón, el entrenamiento no parece operar a través de la apertura del canal K_{ATP} en lo que a la refractariedad y heterogeneidad se refiere; antes bien al contrario, ya que si bien el entrenamiento aumenta la refractariedad y disminuye la heterogeneidad electrofisiológica, la apertura del citado canal disminuye la refractariedad y aumenta la heterogeneidad electrofisiológica, y por tanto haciendo al miocardio ventricular más sensible a las arritmias reentrantes.
2. En el corazón de animal entrenado, sometido a isquemia regional aguda se mantienen los parámetros de refractariedad en las fases más prematuras del proceso isquémico, y en el tratado con un abridor del canal K_{ATP} , contrariamente, la isquemia incrementa la

5. Conclusiones.

refractoriedad en el miocardio afectado por el proceso isquémico, lo que interpretamos como signo de deterioro del “estatus” metabólico del miocardio ventricular. En este sentido el entrenamiento no parece actuar tampoco a través de la apertura del canal K_{ATP} .

3. En el corazón de animal entrenado, sometido a isquemia regional aguda la heterogeneidad electrofisiológica del corazón sigue un camino opuesto al corazón sometido al efecto del abridor del canal K_{ATP} ; situación ésta que incrementa la heterogeneidad. También en este sentido el entrenamiento no parece actuar a través de la apertura del canal K_{ATP} .

4. En condiciones de oxigenación, la apertura del canal K_{ATP} tiene un efecto claramente arritmogénico evidenciado por la fácil inducibilidad de la fibrilación ventricular, lo que no ocurre en los corazones entrenados. Ambas situaciones caminan en direcciones diferentes.

5. En condiciones de isquemia regional aguda, la apertura del canal K_{ATP} tiene un efecto claramente arritmogénico evidenciado por la difícil reversión de la fibrilación ventricular con choques eléctricos, lo que no ocurre en los corazones procedentes de conejos entrenados. Ambas situaciones caminan en direcciones diferentes.

6. Comoquiera que los resultados correspondientes a los efectos del entrenamiento y los debidos a la apertura del canal K_{ATP} , no van en la misma dirección, sino en sentido contrario, no parece que, al menos a nivel electrofisiológico, la protección debida al ejercicio sea debida a una acción de apertura del canal K_{ATP} , lo que obliga al importante número de autores que defienden esta hipótesis, a dar respuesta a qué mecanismos pueden subyacer a nuestros resultados.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Astrand P. Textbook of work physiology: Physiological bases of exercise (4th ed.). Champaign IL: Human Kinetics, 2003.

Bers DM, Barry WH, Despa D. Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 57:897–912, 2003.

Billman GE and 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, Kukielka M, Kelley R, Moustafa-Bayoumi M and 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. Aerobic exercise conditioning: a nonpharmacological antiarrhythmic intervention. *J Appl Physiol.* 92(2): 446–454, 2002.

Billman GE. Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1171-H1193, 2009

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

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

Bjornstad H, Smith G, Storstein L, Meen HD and Hals O. Electrocardiographic and echocardiographic findings in top athletes, athletic students and sedentary controls. *Cardiology,* 82(1), 66-74, 1993.

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

6. Referencias bibliográficas.

Blomqvist CG and Saltin B. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annual Review of Physiology*, 45, 169-189, 1983.

Blumenthal JA, Fredrikson M, Kuhn CM, Ulmer RL, Walsh-Riddle M, and Appelbaum M. Aerobic exercise reduces levels of cardiovascular and sympathoadrenal responses to mental stress in subjects without prior evidence of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 65(1), 93-98, 1990.

Bolli R. Preconditioning: A paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H19-H27, 2006.

Boraita A y Serratosa L. El corazón del deportista: hallazgos electrocardiográficos más frecuentes. *Rev ASP Cardiol*, 51: 356-368, 1998.

Boraita Pérez A, Serratosa Fernández L. Sudden death (IV). Sudden death in the athlete. The minimal requirements before performing a competitive sport. *Rev Esp Cardiol*, 52:12 (1139-1145),1999.

Bouchard C1, Tremblay A, Nadeau A, Dussault J, Després JP, Theriault G, Lupien PJ, Serresse O, Boulay MR, Fournier G. Long-term exercise training with constant energy intake. 1. Effect on body composition and selected metabolic variables. *Int J Obes*, 14(1), 57- 73, 1990.

Bowers RW and Fox EL. *Fisiología del deporte*(3ª ed.). Buenos Aires etc.: Editorial Médica Panamericana, 1995.

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.

Brorson L, Conradson TB, Olsson B and Varnauskas E. Right atrial monophasic action potential and effective refractory periods in relation to physical training and maximal heart rate. *Cardiovasc Res*, 10(2), 160-168, 1976.

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

Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA and 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.

Brugada J, Boersma L, Kirchhof C, Brugada P, Havenith M, Wellens HJ, Allessie M. Double wave reentry as a mechanism of acceleration of ventricular tachycardia. *Circulation*, 81(5), 1633-1643, 1990.

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

Cánoves, J. Estudio experimental de la relación existente entre la longitud de onda del proceso de activación miocárdico y las características espectrales de la fibrilación ventricular. Universitat de València (estudi general), 20-21, 2001.

Carey GB. The swine as a model for studying exercise-induced changes in lipid metabolism. *Med Sci Sports Exerc.* Nov;29(11):1437-43, 1997.

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

Chi L, Uprichard A, Licchesi B. Profibrillatory actions of pinacidil in a conscious canine model of sudden death. *J Cardiovasc Pharmacol*; 15: 452-464, 1990.

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

6. Referencias bibliográficas.

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

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

Chorro FJ, Trapero I, Such-Miquel L, Pelechano F, Mainar L, Cánoves J, Tormos A, Alberola A, Hove-Madsen L, Cinca J and 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.

Collins HL, Loka AM and 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.

Collins HL, Dicarlo SE. Acute exercise increases the ventricular arrhythmia threshold via the intrinsic adenosine receptor system in conscious hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(3):H1020-6, 2005.

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

D´Alonzo A, Darbenzio R, Hess T. Effect of potassium on the action of the KATP modulators cromakalim, pinacidil or glibenclamide on arrhythmias in isolated perfused heart subjected to regional ischaemia. *Cardiovasc Res.* 28: 881-887, 1994a.

D´Alonzo A, Hess T, Darbenzio R. Effects of cromakalim or pinacidil on pacing and ischemia-induced ventricular fibrillation in the anesthetized pig. *Basic Res Cardiol* 89: 162-176, 1994b.

de Moraes R, Valente RH, Leon IR, Trugilho MR, Nobrega AC, Perales J and Tibirica E. Chronic dynamic exercise increases apolipoprotein A-I expression in rabbit renal cortex as determined by proteomic technology. *Br J Sports Med,* 42(5), 386-388, 2008.

del-Canto I, Brines L, Such-Miquel L, Parra G, Gallego N, Soler C, Alberola A, Chorro FJ, Guerrero J and 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), 2012.

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

6. Referencias bibliográficas.

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.

Dillon SM. Synchronized repolarization after defibrillation shocks. A possible component of the defibrillation process demonstrated by optical recordings in rabbit heart. *Circulation*, 85(5), 1865- 1878, 1992.

Efimov IR, Sidorov V, Cheng Y, and Wollenzier B. Evidence of three-dimensional scroll waves with ribbon-shaped filament as a mechanism of ventricular tachycardia in the isolated rabbit heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 10(11), 1452-1462, 1999.

Eigel BN, Hadley RW. Contribution of the Na⁺ channel and Na⁺/H⁺ exchanger to the anoxic rise of [Na⁺] in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 46:H1817-22, 1999.

Eliakim A, Brasel JA, Mohan S, Wong WL, and Cooper DM. Increased physical activity and the growth hormone-IGF-I axis in adolescent males. *Am J Physiol*, 275(1 Pt 2), R308-14, 1998.

Faes L, Nollo G, Antolini R, Gaita F, Ravelli F. A method for quantifying atrial fibrillation organization based on wave morphology similarity. *IEEE Trans Biomed Eng.* 49:1504-13, 2002.

Farges JP, Ollagnier M and Faucon G. Influence of acetylcholine, isoproterenol, quinidine and ouabain on effective refractory periods of atrial and ventricular myocardium in the dog. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 227: 206-219, 1977.

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, and Nanthakumar K. Role of KATP channels in the maintenance of ventricular fibrillation in cardiomyopathic human hearts. *Cir Res.* 109(11):1309-1318, 2011.

Faris IB, Jamieson GG, and Ludbrook J. Effect of exercise on gain of the carotid-sinus reflex in rabbits. *Clinical Science*. London, England, 63(2), 115- 119, 1982.

Fedorov VV, Glukhov AV, Ambrosi CM, Kostecki G, Chang R, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Nichols CG, and 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.

Feger BJ, and Starnes JW. Myocardial Na⁺/H⁺ exchanger-1 (NHE1) content is decreased by exercise training. *J Physiol Biochem* 69:305–312, 2013.

Ferrero A. Modificaciones farmacológicas de las propiedades electrofisiológicas cardíacas. Estudio experimental y simulación con modelos matemáticos. Tesis doctoral. Universitat de València, 2005.

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

Frasier CR, Moukdar F, Patel HD, Sloan RC, Stewart, LM, Alleman RJ, La Favor JD, Brown DA. Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. *Cardiovasc Res* 98: 47–55, 2013.

Gao L, Wang W, Liu D, and Zucker IH. Exercise training normalizes sympathetic outflow by central antioxidant mechanisms in rabbits with pacing-induced chronic heart failure. *Circulation*, 115(24), 3095-3102, 2007.

García-Rivas GJ. Canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP y cardioprotección. *REB* 25(1): 20-25, 2006.

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, and 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.

Gaustad SE, Rolim N, and Wisloff U. A valid and reproducible protocol for testing maximal oxygen uptake in rabbits. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*: 17(1), 83-88, 2010.

6. Referencias bibliográficas.

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

Gonca E and 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.

González Gallego, J. Fisiología de la actividad física y del deporte. Madrid etc.: Interamericana, 1992.

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

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

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

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

Guasch E y Mont L. Ranolazina: ¿tratamiento potencial de las arritmias? *Rev Esp Cardiol Supl* 10:62B-72B, 2010.

Guenette J, Witt J, McKenzie D, Road J, Sheel W. Respiratory mechanics during exercise in endurance-trained men and women. *J Physiol* 2007; 581: 1309-22

Guyton AC, and Hall JE. Tratado de fisiología médica (11^a ed.). Madrid: Elsevier, 2006.

Gwathmey JK, Slawsky MT, Perreault CL, Briggs GM, Morgan JP, and Wei JY. Effect of exercise conditioning on excitation-contraction coupling in aged rats. *J. Appl. Physiol.* (Bethesda, Md.: 1985), 69(4), 1366-1371, 1990.

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

Hale SL, Shryock JC, Belardinelli L, Sweeney M, Kloner RA. Late sodium current inhibition as a new cardioprotective approach. *J Mol Cell Cardiol*;44:954-967, 2008.

Hamer M and Stamatakis E. Physical activity and cardiovascular disease: directions for future research. *Open Sports Sci J.* 1:1–2, 2008.

Hamilton KL, Powers SK, Sugiura T, Kim S, Lennon S, Tumer N, Mehta JL. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(3):H1346-52, 2001.

Hamra M and McNeil R. Accentuated antagonism in canine subendocardium is not altered by chronic exercise. *Med Sci Sports Exerc* 29: 1013-1020, 1997.

Han J, Moe GK. Adrenergic effects on ventricular vulnerability. *Circ Res.* Jun;14:516-24, 1964.

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

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: 291–366, 2010.

Houston ME, and Thomson JA. The response of endurance-adapted adults to intense anaerobic training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.*, 36(3), 207-213, 1977.

Hull SS, Jr Vanoli E, Adamson PB, Verrier RL, Foreman RD, and Schwartz PJ. Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. *Circulation*, 89(2), 548-552, 1994.

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

6. Referencias bibliográficas.

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

Jalife J. Tiempo, espacio y frecuencia en la fibrilación ventricular. *Rev Esp Cardiol*. 59(9):859–861, 2006.

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

James DE, Kraegen EW, and Chisholm DJ. Effects of exercise training on in vivo insulin action in individual tissues of the rat. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(2), 657-666, 1985.

Janse MJ, van der Steen AB, and 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 and Reiner KA. Patobiología de la isquemia miocárdica aguda. *Hospital Practice (Ed. Español)*. 4(7):41–57, 1989.

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

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

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

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

Johnson TA, Gray AL, Lauenstein JM, Newton SS, and Massari VJ. Parasympathetic control of the heart. An interventriculo-septal ganglion is the major source of the vagal intracardiac innervation of the ventricles. *J Appl Physiol* 96: 2265-2272, 2004.

Jover, B., McGrath, B. P., and Ludbrook, J. Haemodynamic and metabolic responses of laboratory rabbits to near-maximal treadmill exercise. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 14(11-12), 811-823, 1987.

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

Kersten JR, Gross GJ, Pagel PS, Warltier DC. Activation of adenosine triphosphate-regulated potassium channels: mediation of cellular and organ protection. *Anesthesiology*:495-513, 1998 .

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

Kleber AG, Janse MJ, Wilms-Schopmann FJ, Wilde AA, and Coronel R. Changes in conduction velocity during acute ischemia in ventricular myocardium of the isolated porcine heart. *Circulation*, 73(1), 189-198, 1986.

Knisley SB, Smith WM, Ideker RE. Effect of field stimulation on cellular repolarization in rabbit myocardium. Implications for reentry induction. *Circ Res*:707-15, 1992.

Kukielka M, Holycross BJ and Billman GE. Endurance exercise training reduces cardiac sodium/calcium exchanger expression in animals susceptible to ventricular fibrillation. *Front. Physio.* 2:3, 2011.

Laughlin MH, Bowles DK, Duncker DJ. The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H10–H23, 2012.

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

Lee E, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, and Powers SK. Exercise Protects Cardiac Mitochondria against Ischemia–Reperfusion Injury. *Med Sci Sports Exerc*, 2012.

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

6. Referencias bibliográficas.

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

Lu H, Remeysen O, De Clerc F. The protection by ischemic preconditioning against myocardial ischemia-and reperfusion-induced arrhythmias is not mediate by ATP-sensitive K⁺ channels in the rat. *Cor Art Dis*; 4: 649-657, 1993.

Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CR, Carvalheira JB, Peres SB, Reis MA, Saad MJ, Boschero AC and Velloso LA. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol* 147: 149-57, 2002.

Lujan, HL, Britton SL, Koch LG, and DiCarlo SE. Reduced susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in rats selectively bred for high aerobic capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(6):H2933–H2941, 2006.

Mace LC, Palmer BM, Browm DA, Jew KN, Lynch JM, Glunt JM, Parsons TA, Cheung JY, and 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, and Rodríguez B. The role of transmural ventricular heterogeneities in cardiac vulnerability to electric shocks. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 96(1-3), 321-338, 2008.

Marcil M, Bourduas K, Ascah A, & Burelle Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca²⁺-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290(4):H1549–H1557, 2006.

Maier SL y Sossalla S. The late Na current as a therapeutic target: Where are we? *J Mol Cell Cardiol*. 61:44–50, 2013.

McPherson CD, Pierce GN, and Cole WC. Ischemic cardioprotection by ATP-sensitive K⁺ channels involves high-energy phosphate preservation. *Am J Physiol*. 265(5 Pt 2):H1809–1818, 1993.

Meng H, Pierce GN. Metabolic and physiological response of the rabbit to continuous and intermittent treadmill exercise. *Can J Physiol Pharmacol*. 68(7):856-62, 1990.

Mezzani A, Giovannini T, Michelucci A, Padeletti L, Resina A, Cupelli V and Musante R. Effects of training on the electrophysiologic properties of atrium and accessory pathway in athletes with Wolff-Parkinson-White syndrome. *Cardiology* 77(4): 295-302, 1990.

Miller NE. Learnable drives and rewards. In: Stevens SS, editor. *Handbook of experimental psychology*. New York: Wiley. pp 435-472, 1951.

Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J*; 67: 200-220, 1964.

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

Morady F, Kou WH, Nelson SD, de Buitelir M, Schmaltz S, Kadish AH, Toivonen LK, and Kushner JA. Accentuated antagonism between beta-adrenergic and vagal effects on ventricular refractoriness in humans. *Circulation* 77: 289-97, 1988.

Nakaya H. Role of ATP-Sensitive K⁺ Channels in Cardiac Arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol*. 19(3) 237-243, 2014.

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

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

Nichols CG, Lederer WJ. The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 183-194, 1990.

Nichols CG, Singh GK and Grange DK. K_{ATP} Channels and Cardiovascular Disease Suddenly a Syndrome. *Circ Res*. 112:1059-1072, 2013.

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

6. Referencias bibliográficas.

Northcote RJ, Canning GP, and Ballantyne D. Electrocardiographic findings in male veteran endurance athletes. *Brit Heart J*, 61(2), 155- 160, 1989.

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

Panfilov AV. Is heart size a factor in ventricular fibrillation? Or how close are rabbit and human hearts? *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*, 3(7), 862-864, 2006.

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

Parra G, Zarzoso M, Such-Miquel L, Brines L, Alberola A, Rams C, Such L, and 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 Valencia, 2011.

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

Pattengale PK and Holloszy JO. Augmentation of skeletal muscle myoglobin by a program of treadmill running. *Am J Physiol* , 213(3), 783-785, 1967.

Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATPdependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267:26062-9,1992.

Pelechano F, Such-Miquel L, Such L, López L, Salvador RE, Chorro FJ, Trapero I, Cebriá A, Gómez P, and 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, and 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, and Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 44(2):193–201, 2008.

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

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

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

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

Rankovic V, Patel N, Jain S, Robinson N, Goldberger J, Horvath G, Kadish A. Characteristics of ischemic and peri-ischemic regions during ventricular fibrillation in the canine heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 10(8), 1090-1100, 1999.

6. Referencias bibliográficas.

Rardon DP, and Bailey JC. Parasympathetic effects on electrophysiologic properties of cardiac ventricular tissue. *J Am Coll Cardiol.*, 2(6), 1200-1209, 1983.

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

Rogers JM, Huang J, Smith WM, and Ideker RE. Incidence, evolution and spatial distribution of functional reentry during ventricular fibrillation in pigs. *Circ Res*, 84(8), 945-954, 1999.

Ropella KM. Frequency domain analysis of endocardial signals. *Annali Dell'Istituto Superiore diSanita*, 37(3), 351-359, 2001.

Saint D, Ju Y-K, and Gage PW. A persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 453:219-231, 1992.

Schaible TF, and Scheuer J. Cardiac adaptations to chronic exercise. *Progress in cardiovascular diseases*, 27(5), 297-324, 1985.

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

Selkurt E. *Physiology* (5th ed.). Boston: Little, Brown and Company, 1984.

Sharma S, Merghani A and Mont L. Exercise and the heart: the good, the bad, and the ugly. *Eur Heart J* 36, 1445-1453, 2015.

Shigematsu S, Sato T, Abe T, Saikawa T, Sakata T, Arita M. Pharmacological evidence for the persistent activation of ATPsensitive Kchannels in early phase of reperfusion and its protective role against myocardial stunning. *Circulation* 92: 2266-2275, 1995.

Smallwood JK, Steinberg MI. Cardiac electrophysiological effects of pinacidil and related pyridylcyanoguanidines: relationship to antihypertensive activity. *J Cardiovasc Pharmacol*; 12: 102-109, 1988.

Soler C, Such-Miquel L, Brines L, del Canto I, Gallego N, Parra G, Guerrero J, Zarzoso M, Koninckx M, Such-Belenguer L. Physical training and ikatp blockade maintain myocardial conduction velocity after acute

coronary occlusion in isolated rabbit heart. *Eur Heart J.* 35 (suppl 1). P1426: 733, 2014.

Stein R, Medeiros CM, Rosito GA, Zimmerman LI and Ribeiro JP. Intrinsic sinus and atrioventricular node electrophysiologic adaptations in endurance athletes. *J Am Coll Cardiol* 39: 1033-38, 2002.

Stein R, Moraes RS, Cavalcanti AV, Ferlin EL, Zimmerman LI and Ribeiro JP. Atrial automaticity and atrioventricular conduction in athletes: contribution of autonomic regulation. *Eur J Appl Physiol* 82: 155-157, 2002.

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

Stones R, Billeter R, Zhang H, Harrison S, White E. The role of transient outward K⁺ current in electrical remodeling induced by voluntary exercise in female rat hearts induced by voluntary exercise in female rat hearts. *Basic Res Cardiol.* 104:643-652, 2009.

Strohmenger HU, Lindner KH and 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.

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

Stuewe Steven R, Gwartz, Patricia A, Agarwal Neeraj and Mallet, Robert T. Exercise Training Enhances Glycolytic and Oxidative Enzymes in Canine Ventricular Myocardium. 2000.

Such L, Alberola A, Orts L, Such-Miquel L, Pelechano F, Trapero I, Cebria A and 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 and Chorro FJ. Effects of chronic exercise on myocardial refractoriness: a study on isolated rabbit heart. *Acta Physiol.* 193(4):331-339, 2008.

6. Referencias bibliográficas.

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

Such-Mique L, Chorro FJ, Guerrero J, Trapero I, Brines L, Zarzoso M, Parra G, Soler C, del Canto I, Alberola A and Such L. Evaluation of the Complexity of Myocardial Activation During Ventricular Fibrillation. An Experimental Study. *Rev Esp Cardiol* 66:177–184, 2013.

Such-Miquel L, Trapero I, Pelechano F, López L, Salvador RE, Cebriá A, Díaz B, Chorro FJ, Alberola A and 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.

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

Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C and Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*, 62(1), 9-33, 2004.

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 and Roberts NK. Influence of exercise on excitation- contraction coupling in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 240: H472- H480, 1981.

Tonkonogi M and Sahlin K. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, 30(3), 129- 137, 2002.

Trapero I, Chorro FJ, Such-Miquel L, Cánoves J, Tormos A, Pelechano F, López L and Such L. Effect of streptomycin on stretch-induced change in

myocardial activation during ventricular fibrillation. *Rev Esp Cardiol.* 61(2):201–205, 2008.

Uchida T, Yashima M, Gotoh M, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN, Fishbein MC, Mandel WJ, Chen PS, Karagueuzian HS. Mechanism of acceleration of functional reentry in the ventricle. Effects of ATP-sensitive channel opener. *Circulation*; 99: 704-712, 1999.

Vajda S, Baczkó I and 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.

Vanoli E, De Ferrari GM, Stramba-Badiale M, Hull SS, Jr Foreman RD and Schwartz PJ. Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res*, 68(5), 1471-1481, 1991.

Warner MR and Zipes DP. Vagal control of myocardial refractoriness. In M. N. Levy, and P. J. Schwartz (Eds.), *Vagal control of the heart: Experimental basis and clinical implications* (pp. 261- 276). Armonk, NY: Futura, 1994.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R and 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 and 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 and Janse MJ. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev.* 69(4):1049–1169, 1989.

Witkowski FX, Leon LJ, Penkoske PA, Giles WR, Spano ML, Ditto WL, Winfree AT. Spatiotemporal evolution of ventricular fibrillation. *Nature*, 392(6671), 78-82, 1998.

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

6. Referencias bibliográficas.

Yamada M, Ishii M, Hibino H and Kurachi Y. Mutation in nucleotidebinding 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.

Yamamoto K, Miyachi M, Saitoh T, Yoshioka A and Onodera S. Effects of endurance training on resting and post-exercise cardiac autonomic control. *Med Sci Sports Exerc.* 33(9), 1496-1502, 2001.

Yamashita N, Baxter GF and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and Zingman LV. Reduction in number of sarcolemmal KATP channels slows cardiac action potential duration shortening under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 415:637–641, 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 and Terzic A. Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci.* 99:13278–13283, 2002.

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

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

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

Zuti WB, and Golding LA. Comparing diet and exercise as weight reduction tools. *Phys Sports Med.* 4, 49-54, 1976.

Zygmunt AC, Eddlestone GT, Thomas GP, Nesterenko VV, Antzelevitch C. Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:H689–97, 2001.