

# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



**FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA**  
Programa de Doctorado en Fisiologia

**“Implicación del canal KATP en las modificaciones que la realización de ejercicio físico crónico produce sobre algunas propiedades electrofisiológicas en el miocardio. Estudio en corazón aislado sometido a isquemia global aguda”**

**Tesis doctoral presentada por:**

Carlos Soler López.

**Dirigida por:**

Dr. D. Luis Such Belenguer.

Dr. D. Antonio Iradi Casal.

Dr. D. Fco. Javier Chorro Gascó.

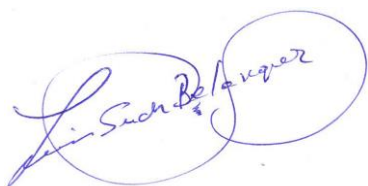
Valencia, noviembre 2018.



Luis Such Belenguer, Catedrático de Universidad del Departament de Fisiologia de la Universitat de València-Estudi General, Antonio Iradi Casal, Catedrático de Universidad del Departament de Fisiologia de la Universitat de València-Estudi General y Francisco Javier Chorro Gascó, Catedrático de Universidad del Departament de Medicina de la Universitat de València-Estudi General,

CERTIFICAN: que el trabajo experimental que lleva por título “**Implicación del canal K<sub>ATP</sub> en las modificaciones que la realización de ejercicio físico crónico produce sobre algunas propiedades electrofisiológicas en el miocardio. Estudio en corazón aislado sometido a isquemia global aguda**”, presentado por Carlos Soler López para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departament de Fisiologia de la Universitat de València-Estudi General.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia, noviembre de 2018.



Luis Such Belenguer.



Antonio Iradi Casal.



Fco. Javier Chorro Gascó.



El presente trabajo de investigación ha podido ser realizado, al menos en parte, gracias a la ayuda concedida al doctorando para la formación de personal investigador de carácter predoctoral, en el marco del subprograma “Atracció de Talent” Vlc-campus, por el Vicerrectorado de Investigación y Política Científica de la Universitat de València Estudi General.



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría hacer extensivo un sincero y generalizado agradecimiento a todo el Departamento de Fisiología, uno de los más grandes y con mayor representación de la Universitat, donde he conocido innumerables personas de altísimo valor humano que de un modo u otro han influido en mi vida y me han ayudado a crecer como persona. Gracias a todos.

De forma particular quiero agradecer la confianza depositada a mis tres directores:

Entré en el Departamento de la mano del Profesor D. Luis Such Belenguer y siempre le estaré agradecido por abrirme las puertas de su casa y por darme la oportunidad de conocer desde dentro el mundo de la investigación, la docencia comprometida y el espíritu que debe dirigir el quehacer universitario. Gracias de corazón Luis.

Gracias también al Dr. Francisco Javier Chorro Gascó, nombrado recientemente Decano de esta Facultad, con una implicación docente encomiable y una extraordinaria capacidad de trabajo que le ha llevado a ser uno de los referentes nacionales de la investigación en el ámbito de la Cardiología Experimental. Todo sin perder un ápice de humildad en el trato. Gracias Javier.

Sin olvidar al Dr. Antonio Iradi Casal, que desde que entré a formar parte de esta gran familia, y hasta hace bien poco, ha desarrollado de forma impecable la dura labor de Director del Departamento, y a quien siempre recordaré con admiración dirigiendo con maestría las siempre complicadas reuniones del Consejo de Departamento.

Hace ya más de ocho años desde que entré a formar parte del Grupo de Electrofisiología Cardíaca Experimental (GRELCA), y no puedo dejar de acordarme de todas y cada una de las personas que a lo largo de este tiempo han pasado por el laboratorio y por las que lo sustentan en la actualidad, profesores, investigadores, estudiantes... de entre todos ellos, me gustaría agradecer de forma especial a Antonio Alberola Aguilar, Fisiólogo de corazón, y donde los haya, por su generosidad y su disposición con los alumnos. De igual forma, a Luis Jr., Germán, Manolo, Laia, Irene (¡qué paciencia has tenido!... muchas gracias Irene), Laura, Patri, Óscar, Dani, Catia, Manu, Jaume y un largo etcétera. ¡Ah!... y a Mari Blanch y Rosario Salvador, por su infinita ayuda durante estos años, también jalonada de incombustible paciencia. También al Gran Santiago, que me ha tratado siempre, casi como a un hijo y me ha hecho sentir también como en mi propia casa.

Finalmente, como no podría ser de otra manera, quiero agradecer a mi familia y a mis amigos, para mí los auténticos pilares de la vida, su apoyo durante estos duros años que nos ha tocado vivir y con un cariño muy especial a mi madre, que ha tenido que sufrir por partida doble; a mi hermano Curro que se ha “echado a la familia por montera” y sin él no hubiéramos salido adelante; y a mi tía Mari, por su interés, su cariño y su ayuda constante.

Por último, aunque no existen palabras para hacerlo, quiero agradecer y dedicar especialmente esta Tesis Doctoral, con el máximo cariño, a aquellos que ya no se encuentran entre nosotros y que, sin duda, habrían disfrutado enormemente compartiendo este momento conmigo.



*"Si vas a emprender el viaje hacia Staca, pide que tu camino sea largo, rico en experiencia y en conocimiento..."*

*Pide que tu camino sea largo. Que numerosas sean las mañanas de verano en que con placer, felizmente arribes a bahías nunca vistas.*

*Detente en los emporios de Fenicia y adquiere hermosas mercancías, madreperlas y coral, y ámbar y ébano, cerámicas deliciosas y diversas.*

*Cuanto puedas invierte en voluptuosos y delicados perfumes, visita muchas ciudades de Egipto, y con avidez aprende de sus sabios.*

*Ten siempre a Staca en la memoria. Llegar allí es tu meta. Mas no apresures el viaje.*

*Mejor que se extienda largos años; y en tu vejez arribes a la isla con cuanto hayas ganado en el camino, sin esperar que Staca te enriquezca.*

*Staca te regaló un hermoso viaje. Sin ella no hubieras emprendido el camino. Mas ninguna otra cosa puede darte.*

*Aunque pobre la encuentres, Staca no te ha engañado. Rico en saber y vida, como has llegado, comprendes ya qué significan las Stacas".*

**Konstantinos Kavafis**



# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>1.1. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>1.2. JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS</b> .....	18
<b>1.2.1. Estudio de las modificaciones cardiovasculares por el ejercicio físico crónico, con especial referencia a las modificaciones electrofisiológicas</b> .....	18
1.2.1.1 Generalidades .....	18
1.2.1.2 Estudio especial de los efectos sobre la refractariedad y heterogeneidad como parámetros estrechamente relacionados con la instauración de fenómenos de reentrada .....	25
<b>1.2.2. Generalidades sobre los efectos biológicos de la isquemia Miocárdica</b> .....	34
1.2.2.1 Procesos bioquímicos en el corazón isquémico .....	34
1.2.2.2 Modificaciones de las concentraciones de iones: $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{H}^+$ .....	37
1.2.2.3 Modificaciones electrofisiológicas en la isquemia aguda .....	41
<b>1.2.3. Estudio especial de la participación del canal KATP en las modificaciones electrofisiológicas por la isquemia aguda</b> .....	51
<b>1.2.4. Efectos protectores del ejercicio físico crónico sobre las consecuencias electrofisiológicas miocárdicas de la isquemia aguda: implicación del canal KATP</b> .....	57

1.2.4.1 Dinámica del canal KATP en la isquemia aguda del miocardio y su relación con el efecto protector del ejercicio físico .....	57
1.2.4.2 Aparentes controversias respecto a la participación del canal KATP en los efectos beneficiosos del ejercicio físico crónico .....	62
<b>1.3. RESUMEN DE LA JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>65</b>
<b>1.4. PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>66</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
<b>2.1. MATERIALES.....</b>	<b>69</b>
2.1.1. Animales de experimentación .....	69
2.1.2. Reactivos .....	69
2.1.3. Aparatos.....	70
2.1.4. Sistemas y programas informáticos.....	71
2.1.4.2 Sistema de soporte metabólico tipo Langendorff .....	71
2.1.4.3 Sistemas de estimulación .....	75
2.1.4.3 Sistemas de registro .....	76
2.1.4.4 Programas informáticos .....	77
<b>2.2. MÉTODOS .....</b>	<b>79</b>
2.2.1. Grupos de estudio.....	79
2.2.2. Protocolo de entrenamiento.....	79
2.2.3. Protocolo experimental.....	80
2.2.4. Protocolo electrofisiológico.....	82

<b>2.2.5. Parámetros electrofisiológicos objeto de estudio: definición y</b>	
determinación .....	84
<b>2.2.5.1 Para la valoración del cronotropismo.....</b>	<b>84</b>
2.2.5.1.1 Longitud del ciclo sinusal (LCS) .....	84
<b>2.2.5.2 Para la valoración de la conducción auriculoventricular ....</b>	<b>85</b>
2.2.5.2.1 Longitud del intervalo A-V .....	85
<b>2.2.5.3 Para valorar la refractariedad miocárdica .....</b>	<b>86</b>
2.2.5.3.1 Periodo refractario efectivo ventricular (PREV).....	86
2.2.5.3.2 Periodo refractario funcional ventricular (PRFV).....	86
2.2.5.3.3 Frecuencia dominante (FD) de la FV .....	87
2.2.5.3.4 Periodo refractario funcional durante la FV (PRFFV).....	88
2.2.5.3.5 Intervalos diastólicos del ciclo fibrilatorio (V-V) .....	89
<b>2.2.5.4 Para valorar la heterogeneidad electrofisiológica.....</b>	<b>90</b>
2.2.5.4.1 Coeficiente de variación de los PRFV (CVPRFV).....	90
2.2.5.4.2 Concentración espectral (CE) de la FV .....	92
2.2.5.4.3 Coeficiente de variación de los intervalos diastólicos	
del ciclo fibrilatorio (CVVV).....	93
<b>2.2.5.5 Para valorar arritmogénesis .....</b>	<b>93</b>
2.2.5.5.1 Inducibilidad de la fibrilación ventricular (IFV).....	93
2.2.5.5.2 Incidencia de desfibrilación espontánea (DFV) .....	94
<b>2.2.5.6 Para valorar la viabilidad eléctrica .....</b>	<b>94</b>
2.2.5.6.1 Incidencia asistolia eléctrica .....	94

<b>2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	96
<b>2.4. LEGISLACIÓN</b> .....	96
<b>3. RESULTADOS</b> .....	97
<b>3.1. CRONOTROPISMO</b> .....	99
3.1.1 Longitud del ciclo sinusal (LCS).....	99
<b>3.2. CONDUCCIÓN</b> .....	100
3.2.1 Longitud del intervalo A-V .....	100
<b>3.3. REFRACTARIEDAD MIOCÁRDICA</b> .....	101
3.3.1 Periodo refractario efectivo ventricular (PREV) .....	101
3.3.2 Periodo refractario funcional ventricular (PRFV).....	103
3.3.3 Frecuencia dominante (FD) de la FV .....	104
3.3.4 Intervalos diastólicos del ciclo fibrilatorio (V-V) .....	105
3.3.5 Periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular .....	106
<b>3.4. HETEROGENEIDAD MIOCÁRDICA</b> .....	108
3.4.1 Coeficiente de variación del PRFV (CVPRFV).....	108
3.4.2 Concentración espectral (CE) de la FV .....	109
3.4.3 Coeficiente de variación de los intervalos diastólicos del ciclo fibrilatorio (CVVV).....	110
<b>3.5. ARRITMOGÉNESIS</b> .....	111
3.5.1 Inducibilidad de la fibrilación ventricular (IFV) .....	111
3.5.2 Incidencia de desfibrilación espontánea (DFV) .....	112
<b>3.6. VIABILIDAD ELÉCTRICA</b> .....	113
3.6.1 Incidencia de asistolia eléctrica .....	113

<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	117
<b>4.1. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LOS MATERIALES Y MÉTODOS EMPLEADOS</b> .....	119
4.1.1. Respecto al modelo animal utilizado.....	119
4.1.2. Respecto al sistema de perfusión Langendorff.....	120
4.1.3. Respecto al protocolo de entrenamiento.....	122
4.1.4. Respecto a la metodología para la determinación de los parámetros electrofisiológicos .....	123
<b>4.2. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LOS RESULTADOS OBTENIDOS</b> .....	126
4.2.1. Respecto al cronotropismo sinusal .....	126
4.2.2. Respecto a la conducción auriculoventricular .....	127
4.2.3. Respecto a la refractariedad miocárdica.....	128
4.2.4. Respecto a la heterogeneidad electrofisiológica.....	137
4.2.5. Respecto a la inducibilidad de la fibrilación ventricular .....	142
4.2.6. Respecto a la desfibrilación espontánea .....	144
4.2.7. Respecto a la viabilidad eléctrica miocárdica.....	145
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	149
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	155





---

# **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1. OBJETIVOS.**

Investigar la participación del canal KATP en las modificaciones electrofisiológicas cardíacas intrínsecas, relacionadas con la instauración, mantenimiento y cese de la fibrilación ventricular (FV), producidas por el ejercicio físico crónico en el miocardio ventricular, bajo perfusión normalmente oxigenada, y en el sometido a isquemia global normotérmica.

En concreto, pretendemos determinar en corazones aislados de conejo pertenecientes a un grupo de animales control, a un grupo de animales sometido a un protocolo de entrenamiento físico y a dos grupos experimentales, uno tratado con glibenclamida, bloqueante del canal de potasio ATP-dependiente, y otro con pinacidil, agonista del mismo, el automatismo y la conducción cardíacas, la refractariedad y heterogeneidad electrofisiológicas, la inducibilidad de la fibrilación ventricular y las características del patrón fibrilatorio tanto en condiciones de normal oxigenación como durante el periodo de cese completo de la perfusión coronaria, prestando especial atención a la incidencia de desfibrilación espontánea y asistolia eléctrica, con el objetivo de establecer similitudes, o en su caso divergencias, entre el comportamiento electrofisiológico de los grupos tratados y el grupo entrenado que puedan contribuir a esclarecer la participación y el grado de modulación del mencionado canal en las modificaciones electrofisiológicas producidas por el entrenamiento que han sido objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

## 1. Introducción

### **1.2. JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS.**

#### **1.2.1 Estudio de las modificaciones cardiovasculares por el ejercicio físico crónico, con especial referencia a las modificaciones electrofisiológicas.**

##### **1.2.1.1. Generalidades.**

La práctica regular de ejercicio físico aeróbico, de suficiente intensidad, frecuencia y duración, produce adaptaciones morfológicas y/o funcionales en numerosos órganos y sistemas, que generalmente tienen una repercusión positiva sobre la salud. Durante la realización de ejercicio se producen variaciones en los requerimientos metabólicos de los diferentes tejidos lo cual condiciona un aumento de la ventilación e intercambio de gases a nivel pulmonar, un incremento en la frecuencia y el gasto cardiaco así como la redistribución del flujo sanguíneo hacia los territorios con mayores demandas energéticas como el músculo esquelético o el propio miocardio. Exposiciones continuadas a estas respuestas hemodinámicas, metabólicas, nerviosas y endocrinas agudas, induce adaptaciones, a medio-largo plazo, en el organismo que determinan un incremento en la capacidad de reacción frente al esfuerzo (Åstrand *et al.*, 2003). Estas adaptaciones fisiológicas derivadas del ejercicio físico crónico suelen ser resultado de regulaciones de retroalimentación negativa que se ponen en marcha para ayudar a minimizar los cambios homeostáticos que ocurren durante el esfuerzo (Lamb *et al.*, 1989).



**Figura 1.1.** Interrelaciones que implica la respuesta al entrenamiento. Modificado de Lamb, 1989.

El conjunto de estas modificaciones constituye un estado o situación de entrenamiento que permite al individuo desarrollar mayores cargas de trabajo con menores frecuencias cardíacas, a cualquier nivel por debajo del máximo de ejercicio (Fletcher *et al.*, 2001). En el individuo entrenado confluyen adaptaciones metabólicas, bioquímicas, endocrinas, respiratorias y circulatorias, entre otras, que contribuyen a la optimización de procesos como el aumento de la captación de oxígeno o la eliminación de productos de desecho metabólico que contribuyen a reducir la susceptibilidad a la fatiga y a incrementar la capacidad para la ejecución de ejercicio físico (Segal, 2017).

En el músculo esquelético, el ejercicio físico aeróbico regular produce un aumento en el contenido de mioglobina, un incremento del número, tamaño y área de superficie de las mitocondrias, junto a un incremento de la actividad y concentración de las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs y el sistema de transporte de electrónico, fenómenos que determinan una mayor capacidad del organismo para la

## 1. Introducción

oxidación de los hidratos de carbono. De manera análoga, el entrenamiento facilita el metabolismo de las grasas, reduciéndose la depleción de glucógeno, la producción de ácido láctico y la concentración de lactato en plasma, lo que se traduce en el individuo entrenado en un aumento del umbral anaeróbico. Se ha demostrado que, para una misma carga de trabajo, la concentración plasmática de lactato es menor en los individuos que han seguido programas de entrenamiento, evidenciando una menor liberación por los tejidos y una mayor capacidad de eliminación del metabolito derivada del entrenamiento (Zarzoso, 2011). También se ha publicado que el entrenamiento eleva los niveles cardíacos de glucógeno lo que representaría un incremento de la reserva energética disponible bajo circunstancias de estrés metabólico como durante el esfuerzo o la isquemia miocárdica aguda (Powers *et al.*, 2008).

Respecto a los cambios que acontecen a nivel del sistema cardiovascular destacan las modificaciones en la masa miocárdica, en la propia función mecánica y en las propiedades electrofisiológicas de automatismo, conducción, refractariedad, heterogeneidad y estabilidad eléctrica que describiremos en profundidad en apartados posteriores. También se han documentado efectos vasculares sobre la circulación coronaria como el aumento del diámetro de arterias y arteriolas o la preservación de la densidad capilar en relación al grado de hipertrofia cardíaca (Laughlin *et al.*, 2012). Asimismo, se ha de resaltar la mayor diferencia arteriovenosa de oxígeno encontrada en deportistas de resistencia respecto a la población general (Mitchell *et al.*, 2005). Como sabemos, la mayor captación de oxígeno por los tejidos resulta imprescindible para que el organismo pueda asumir el incremento en los

requerimientos metabólicos que supone la realización de ejercicio físico aeróbico. Las siguientes adaptaciones que se producen en el propio miocardio contribuyen a proveer a los tejidos con el oxígeno necesario:

A pesar de que el entrenamiento aeróbico produce una disminución de la frecuencia cardíaca en reposo (Bonaduce *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 1998) y submáxima durante el ejercicio (Wilmore *et al.*, 2001; Skinner *et al.*, 2003) se ha documentado que el gasto cardíaco no suele variar (Saltin *et al.*, 1968, citado por Fletcher *et al.*, 2001), por lo que la menor frecuencia cardíaca se compensaría con un aumento concomitante del volumen sistólico. Schaible y Scheuer (1985), atribuyeron el aumento de la capacidad de eyección del corazón al incremento en el volumen de las cámaras cardíacas que albergarían una mayor cantidad de sangre durante la diástole, facilitando el retorno venoso, una mayor distensión de las paredes cardíacas, y un mayor volumen sistólico asociado al mecanismo de Frank-Starling. En la misma dirección, Pelliccia *et al.*, (1991) llegaron a la conclusión de que el mayor volumen sanguíneo devuelto a la circulación sistémica en cada latido estaría relacionado con el mayor llenado ventricular. Diversos estudios experimentales, tanto en corazón aislado (Fitzsimons *et al.*, 1990; Jin *et al.*, 2000) como en cardiomiocitos (Molé *et al.*, 1978; Diffe *et al.*, 2001; Wisloff *et al.*, 2001) han demostrado que, efectivamente, existe una mejora en la función contráctil intrínseca de los individuos entrenados y que un estado inotrópico aumentado podría jugar un papel importante en la mejora del corazón como bomba (Fletcher *et al.*, 2001).

## 1. Introducción

Además del volumen telediastólico (Hepp *et al.*, 1974; Levine *et al.*, 1991; Blomqvist y Saltin, 1983), se ha comprobado que las variaciones en la postcarga (Jin *et al.*, 2000) influyen de manera determinante sobre los cambios que se producen en la morfología cardíaca tras un periodo de entrenamiento. El aumento de la presión que el miocardio debe vencer en los individuos entrenados se puede traducir, además de en un incremento del tamaño de las cámaras cardíacas, en una hipertrofia o engrosamiento de la pared del ventrículo izquierdo. Sin embargo, el grado y tipo de hipertrofia es variable y se encuentra directamente relacionado con la duración, la clase de práctica deportiva y la intensidad del entrenamiento (Boraita y Serratos, 1998). Spirito *et al.*, (1994), en un estudio en el que contaron con la participación de 947 deportistas de élite, encontraron dimensiones cardíacas y grosores ventriculares mayores en ciclistas, remeros y nadadores. Existen dos formas principales de adaptación del corazón del deportista: respuestas a deportes dinámicos con un alto componente aeróbico que conllevan un incremento del volumen de las cámaras (hipertrofia excéntrica) y respuestas a deportes estáticos con un elevado componente anaeróbico que produce cambios en la masa del ventrículo izquierdo, dando lugar a una hipertrofia fundamentalmente concéntrica sin apenas aumento del volumen de la cavidad ventricular (Pelliccia *et al.*, 1991). El remo, el ciclismo o la natación constituirían una forma mixta de remodelación en la que se combinarían ejercicios dinámicos y estáticos de grandes grupos musculares a intensidades elevadas que explicarían los incrementos tanto en tamaño como en espesor del ventrículo izquierdo hallados en ciclistas y remeros (Pluim *et al.*, 2000).



A pesar de que no se han esclarecido totalmente, parece que los mecanismos, a través de los cuales, se producirían estas adaptaciones comprenderían por tanto: el aumento de la carga y del volumen de llenado, el aumento de la presión y según algunos autores, la estimulación continuada por catecolaminas (Opie, 2004) e incluso factores relacionados con la predisposición genética.

Además de las modificaciones citadas, de carácter bioquímico y mecánico, la práctica regular de ejercicio físico de resistencia produce cambios en varios parámetros electrofisiológicos cardiacos en reposo tales como el automatismo y la conducción auriculoventricular. Las primeras observaciones de algunos cambios electrofisiológicos del miocardio producidos por la práctica de ejercicio físico se publicaron a principios del siglo XX, cuando se detectó la depresión del cronotropismo sinusal en reposo en atletas olímpicos (Bramwell y Ellis, 1929). Posteriormente se describió, de nuevo, la disminución de la frecuencia cardíaca en reposo y durante la realización de ejercicio de intensidad submáxima en comparación a los individuos sedentarios (Blumenthal *et al.*, 1990; Bonaduce *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 1998; Wilmore *et al.*, 2001; Skinner *et al.*, 2003; citados por Zarzoso, 2011). Otras observaciones experimentales (Such *et al.*, 2002 y 2008) y en atletas sometidos a bloqueo farmacológico de los sistemas simpático y parasimpático (Stein *et al.*, 2002) han contribuido, no solamente a asentar estas observaciones previas sobre los efectos que el entrenamiento físico produce sobre el automatismo sinusal, si no que además, dicho efecto se debe a modificaciones tanto de la actividad del sistema nervioso autónomo como a factores intrínsecos cardiacos (Such *et al.*, 2002, 2008; Zarzoso *et al.*, 2012).

## 1. Introducción

Se han descrito también efectos del ejercicio regular sobre la conducción auriculoventricular. Bjørnstad *et al.*, (1993) encontraron una depresión de la conducción del impulso eléctrico desde aurículas a ventrículos al observar una mayor incidencia de bloqueos AV de primer grado en atletas, que además, coexistía con la mencionada disminución de la frecuencia cardíaca en reposo e intuyeron que este bloqueo podría ser inducido asimismo por el entrenamiento. El hecho de que la resolución de los bloqueos auriculoventriculares suela ocurrir durante la práctica de ejercicio (Bjørnstad *et al.*, 1994), permite atribuir la depresión de la conducción AV también a un aumento del tono vagal (Northcote *et al.*, 1989). Posteriormente, Stein *et al.*, (2002), investigando también en atletas de resistencia, realizaron un bloqueo farmacológico del sistema nervioso vegetativo y encontraron que tanto la longitud del ciclo de Wenckebach como la longitud del intervalo AV eran más largos en los atletas que en los sujetos control, evidenciando así, que en la depresión de la conducción auriculoventricular atribuida hasta la fecha a un aumento del tono vagal, participan también factores miocárdicos intrínsecos. Such *et al.*, (2002), confirmaron estas observaciones, esta vez de forma experimental en corazón aislado de conejo, al encontrar de nuevo valores más elevados de ciclo Wenckebach en los corazones procedentes de animales que habían sido previamente entrenados, contribuyendo así a confirmar, que en la depresión de la conducción AV participan factores de carácter intrínseco.

**1.2.1.2. Estudio especial de los efectos sobre la refractariedad y heterogeneidad como parámetros estrechamente relacionados con la instauración de fenómenos de reentrada.**

Son numerosas las investigaciones que describen propiedades antiarrítmicas derivadas de la práctica habitual de ejercicio físico aeróbico. El entrenamiento parece incrementar la estabilidad eléctrica y conferir protección frente a la muerte súbita de origen cardiaco, que en la mayoría de los casos se produce tras la instauración de arritmias por reentrada, principalmente de la fibrilación ventricular (Billman, 2002). Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estas adaptaciones protectoras siguen sin estar completamente dilucidados. El estudio de la modificación de las propiedades electrofisiológicas cardiacas relacionadas con la arritmogénesis a través del entrenamiento puede contribuir a la comprensión de este fenómeno. Comenzaremos resaltando la importancia de la refractariedad miocárdica, como propiedad relacionada con la excitabilidad y su posible modificación resultado de adaptaciones al ejercicio físico continuado:

Una característica común de las células excitables es que, una vez activadas, debe transcurrir un determinado periodo de tiempo para que se pueda generar un segundo potencial de acción (PA). Este intervalo temporal durante el cual la célula no puede ser reexcitada recibe el nombre de periodo refractario. El periodo refractario de las células cardiacas es considerablemente mayor que el de otras células excitables como las neuronas o las células musculares esqueléticas. Este periodo prolongado de inexcitabilidad impide la contracción tónica (tetania) del corazón; fenómeno que, de producirse, tendría fatales

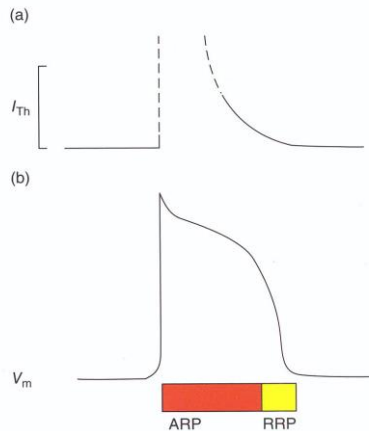
## 1. Introducción

consecuencias para el individuo (Jalife, 2009). La recuperación de la excitabilidad de los miocitos se produce de forma gradual y varía durante las distintas fases del ciclo cardiaco. Se han desarrollado numerosas investigaciones para caracterizar estas modificaciones de la excitabilidad a lo largo del PA tratando de determinar, en cada una de las fases, la intensidad mínima de corriente (intensidad umbral) necesaria para producir un potencial de acción propagado (Mountcastle, 1974).

Se han descrito cuatro estados de excitabilidad: el *período refractario absoluto* que constituye el período de tiempo durante el cual la membrana no puede generar una respuesta ni local ni propagada ante un estímulo externo, independientemente de la intensidad del mismo. Se ha demostrado, sin embargo, que un estímulo de suficiente intensidad y duración puede iniciar una respuesta local o influir sobre el proceso de recuperación en cualquier fase del ciclo cardiaco (Hoffman y Cranefield, 1960; citados por Marshall 1974) por lo que sería más apropiado denominar a esta fase período refractario efectivo (PRE). El *período refractario relativo* (PRR) comienza al final del PRE y constituye el intervalo de tiempo tardío en el PA durante el cual sí es posible la generación de un PA propagado aplicando un estímulo despolarizante de intensidad mayor de lo normal. Esto ocurre una vez avanzada la repolarización, cuando la diferencia de potencial de membrana vuelve a valores de alrededor de -60/-70 mV, los canales de  $\text{Na}^+$  voltaje-dependientes, hasta el momento inactivos, comienzan a ser de nuevo activables y las células recuperan algo de excitabilidad. Sin embargo, la tasa de movimiento de entrada de  $\text{Na}^+$  es tan lenta que es necesaria una

intensidad de corriente mucho mayor para que la entrada de  $\text{Na}^+$  pueda generar un nuevo PA propagado.

En la figura 1.2 se puede observar la variación de la magnitud de corriente umbral ( $I_{\text{Th}}$ ) durante las distintas fases del potencial de acción.



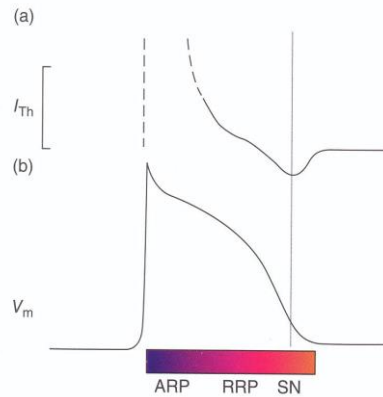
**Figura 1.2.** Periodo refractario. a) Cambios en la amplitud de corriente umbral ( $I_{\text{Th}}$ ) durante el PA. b) Registro de voltaje durante el PA. El periodo refractario absoluto (barra roja) se extiende desde la fase de despolarización rápida hasta el final de la fase de *plateau* (Jalife, 2009).

En el instante de despolarización rápida correspondiente a la fase 0 del PA, cuando los canales de  $\text{Na}^+$  se encuentran inactivos, la  $I_{\text{Th}}$  se vuelve infinita (línea discontinua) y no es posible generar un nuevo PA.

Existe un corto intervalo de tiempo que comienza poco antes de finalizar el PRR en el que se invierte la situación y el umbral es ligeramente inferior al requerido durante la fase de excitación diastólica normal. Esta fase se conoce como período supernormal (PSN), y en ella,

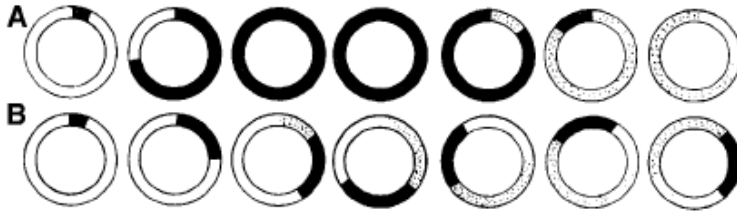
## 1. Introducción

la célula es más excitable que en situación de reposo; es decir, que con un mínimo estímulo despolarizante se puede iniciar un PA propagado por lo que representa un periodo especialmente vulnerable y crucial en la génesis de arritmias (figura 1.3).



**Figura 1.3.** Excitabilidad supernormal. a) Cambios en la amplitud de corriente umbral ( $I_{Th}$ ) durante el potencial de acción. b) Registro de voltaje durante el potencial de acción. En algunos tipos celulares, a la fase de PRR, le sigue un breve intervalo de tiempo durante el cual el umbral es menor que en situación de reposo (Jalife, 2009).

La refractariedad del tejido cardiaco determina, junto a la velocidad de conducción (VC) del impulso eléctrico, la longitud de onda (LO) del proceso de activación del miocardio, factor estrechamente relacionado con la aparición y la estabilización de las arritmias por reentrada (Wijffels *et al.*, 1995; citado por Such *et al.*, 2008). El primer autor en describir los fenómenos de activación eléctrica cardiaca circulares como responsables de la instauración de arritmias por reentrada fue Mayer en anillos de tejido de medusa de la especie *Sycho-medusa cassiopea* (Kléber y Rudy, 2004).



**Figura 1.4.** Modelo de reentrada. Tejido excitado, refractario, marcado en negro; excitable en blanco; refractario relativo a puntos. (a) Cuando el impulso llega al lugar de origen, éste se encuentra en periodo refractario y el impulso se extingue. (b) Tras el giro, el impulso encuentra siempre tejido excitable: se genera la reentrada (modificado de Mines, 1914).

Observó que tanto la iniciación como el mantenimiento de la reentrada requerían de un bloqueo unidireccional de la conducción y que era asimismo dependiente tanto de la VC del impulso eléctrico como del periodo refractario (PR). Definió la LO como el producto de la VC y el PR. En la medida en que la extensión de la zona refractaria que sigue a la onda de excitación es menor que la longitud total de la vía anatómica por la que discurre el impulso, existe una zona de tejido excitable (el llamado *gap* excitable) entre la cola de la onda precedente y la cabeza de la siguiente (Kléber y Rudy, 2004). La existencia de este “hueco” excitable es imprescindible para que se mantengan estables los movimientos circulares ya que si la LO del proceso de activación fuera mayor que la zona anatómica por donde discurre la reentrada, el frente de despolarización se extinguiría al encontrar el tejido en periodo refractario (Kléber y Rudy, 2004). Por lo tanto, periodos refractarios más prolongados son signo de una menor excitabilidad del tejido y de una menor susceptibilidad frente a alteraciones del impulso eléctrico.

## 1. Introducción

Diferentes trabajos han estudiado el efecto del ejercicio físico continuado sobre esta propiedad miocárdica. Así, Brorson *et al.* (1976) observaron un aumento de la duración potencial de acción monofásico en células auriculares humanas en el grupo de individuos entrenados que atribuyeron a un incremento intracelular de la concentración de potasio, aunque no encontraron modificaciones significativas del periodo refractario efectivo. Tibbits *et al.* (1981), también encontraron un incremento en la duración del potencial de acción (DPA), esta vez en células ventriculares, que explicaron por un incremento en la entrada de calcio. Posteriormente, Gwathmey *et al.* (1990), en un estudio experimental investigando el efecto combinado del entrenamiento físico y el envejecimiento, observaron, de nuevo, un aumento de la DPA de las células miocárdicas ventriculares en el grupo entrenado que explicaron a través del mismo mecanismo. Nuestro grupo de investigación también ha venido investigando las modificaciones que el ejercicio físico produce en el miocardio sobre la refractariedad. Los resultados derivados de nuestros primeros trabajos mostraron que el protocolo de ejercicio aplicado a los animales modificaba en el corazón aislado y perfundido, además de la frecuencia cardíaca y la conducción auriculo-ventricular, la refractariedad intrínseca, observándose periodos refractarios funcionales ventriculares (PRFV) mayores en los corazones pertenecientes al grupo de conejos que había completado el periodo de entrenamiento (Such *et al.*, 2002). Resultados obtenidos en trabajos posteriores han confirmado el efecto del entrenamiento físico sobre esta propiedad (Such *et al.*, 2008), y se ha demostrado además, que estas modificaciones electrofisiológicas son, al menos en parte, de carácter intrínseco y no estarían mediadas por la actividad parasimpática post-ganglionar (Zarzoso *et al.*, 2012; Such-Miquel *et al.*, 2018b).



Otra propiedad eléctrica cardíaca indispensable para la formación de un sustrato favorable a la génesis y mantenimiento de este tipo de arritmias es la heterogeneidad miocárdica. La heterogeneidad electrofisiológica, expresión y función de los canales iónicos, las conexiones intercelulares y la estructura tisular, es inherente al tejido cardíaco. El miocardio de trabajo se comporta, desde el punto de vista electrofisiológico, como un sincitio funcional. Sin embargo, éste no es absolutamente homogéneo. Existe falta de continuidad y homogeneidad tanto a nivel estructural, como desde el punto de vista de las propiedades eléctricas de membrana. Encontramos diferencias morfológicas y funcionales entre las distintas regiones ventriculares: ventrículo izquierdo frente a ventrículo derecho, base frente a ápex, endocardio frente a epicardio, etc. Estas variaciones fisiológicas se traducen en propiedades electrofisiológicas distintas a lo largo del territorio cardíaco. Así, Chorro *et al.* (2006) encontraron variaciones en la frecuencia y distribución espacial de la fibrilación ventricular inducida, y observaron en la pared libre del ventrículo izquierdo, que la frecuencia dominante es mayor en las zonas apicales. La heterogeneidad electrofisiológica se acentúa en el remodelado que acontece durante algunas condiciones patológicas como en el caso de la isquemia miocárdica (Kléber y Rudy, 2004). Este hecho resulta determinante en la formación de ondas de reentrada y la perpetuación de las propiedades dinámicas que permiten su mantenimiento (Jalife, 2000).

Por tanto, la heterogeneidad de los periodos refractarios, producidas por las diferencias regionales en la duración del PA a lo largo del tejido, y sobre todo la dispersión espacial de los procesos de repolarización resultan indispensables para la instauración y perpetua-

## 1. Introducción

ción de las arritmias por reentrada (Kléber y Rudy, 2004). Moe y Abildskov (1959) demostraron que la fibrilación auricular podía persistir con una serie de características, independientemente de su agente productor, pero únicamente si existía una “inhomogeneidad” en la repolarización. Posteriormente, Han y Moe (1964), citados por Jalife (2000), volvieron a establecer la importancia de la heterogeneidad en los períodos refractarios para la inducción de la fibrilación ventricular. Este sustrato favorece los bloqueos unidireccionales en la conducción cuando el impulso atraviesa zonas de mayor refractariedad facilitando la reentrada y finalmente el desencadenamiento de la FV (Janse y Wit, 1989).

Se ha publicado que el ejercicio físico atenúa estos efectos de la isquemia sobre la heterogeneidad en diferentes preparaciones experimentales donde se ha encontrado una mayor homogeneidad electrofisiológica miocárdica y una menor incidencia de arritmias letales tras la oclusión arterial coronaria en los animales entrenados (Babai *et al.*, 2002; Hajnal *et al.*, 2005). Resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación apuntan en la misma dirección. Así, Such *et al.* (2006), analizando las características espectrales de la fibrilación ventricular en condiciones de normal oxigenación y tras oclusión coronaria en corazones aislados de conejo, encontraron que el coeficiente de variación de la frecuencia dominante de la señal fibrilatoria se mantenía a los 30 minutos del cese de la perfusión en el grupo de animales entrenados mientras que aumentaba de manera significativa en los controles. Como explicaremos más detalladamente en los apartados correspondientes, el análisis de la señal fibrilatoria, tanto en el dominio del tiempo como en el de la frecuencia, aporta

información indirecta sobre la refractariedad (Chorro *et al.*, 2003) con lo que las observaciones acabadas de comentar indicarían una menor dispersión de la refractariedad en el tejido ventricular isquémico de los animales entrenados. Sin embargo, disponemos de menos información sobre los efectos que la práctica regular de ejercicio físico tiene sobre la mencionada propiedad en el corazón normalmente oxigenado. Pelechano *et al.* (2007) estudiaron, utilizando las mismas técnicas espectrales de análisis de señales las características de la fibrilación ventricular inducida, sin interrumpir la perfusión. Encontraron también una menor dispersión de la frecuencia dominante en los corazones de los animales entrenados, lo que indicaría una menor dispersión de la refractariedad miocárdica intrínseca, es decir, una mayor homogeneidad electrofisiológica del miocardio tras el entrenamiento. Resultados obtenidos en trabajos más recientes, utilizando la misma metodología, parecen indicar que efectivamente el entrenamiento estabiliza de algún modo las propiedades electrofisiológicas del miocardio ventricular. Así, Such *et al.* (2008), Parra (2011), Zarzoso *et al.* (2012), Parra *et al.* (2012), Koninckx (2014) y Alves (2015), relataron disminuciones de la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular inducida con respecto a control en los animales previamente entrenados. Existe una correlación directa entre la frecuencia de activación miocárdica durante la fibrilación ventricular, en condiciones de normal oxigenación, y la heterogeneidad electro-fisiológica (Zaitsev *et al.*, 2000) por lo que estos resultados apuntarían a una mayor homogeneidad y estabilidad de los corazones tras el entrenamiento. Más recientemente, Such-Miquel *et al.*, (2018b) han confirmado el efecto estabilizador del entrenamiento al registrar de forma directa una disminución de la heterogeneidad intrínseca y una mayor estabilidad electrofisiológica en los corazones de los

## 1. Introducción

conejos sometidos a entrenamiento. Los últimos trabajos experimentales sobre ejercicio desarrollados en nuestro laboratorio se enmarcan, al igual que el presente estudio, en la línea que investiga la participación de los canales KATP en las adaptaciones cardiacas al entrenamiento. Se utilizó el coeficiente de variación de los intervalos fibrilatorios como índice de heterogeneidad en los dos estudios y en ambas investigaciones se pudo constatar una menor dispersión de los citados intervalos en los instantes previos a la oclusión arterial en los grupos entrenados. Además se observó que la apertura de los canales tras la administración de pinacidil aumentaba significativamente la heterogeneidad respecto a entrenado (Alves, 2015) y que contrariamente, la glibenclamida producía efectos de homogeneización similares a los apreciados tras el entrenamiento (Koninckx, 2014).

### **1.2.2. Generalidades sobre los efectos biológicos de la isquemia miocárdica.**

#### 1.2.2.1. Procesos bioquímicos en el corazón isquémico.

Se denomina isquemia, del griego *iskhaimos* y constituida por *iskhein* (detener), *haima* (sangre) y el sufijo- *ia* (condición patológica o enfermedad), al estrés celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y el consecuente cese del aporte de oxígeno, nutrientes y de la eliminación de productos de desecho del metabolismo de un tejido biológico. Este sufrimiento celular, se manifiesta en el corazón, con el fracaso de la contracción y el deterioro del comportamiento eléctrico, pudiendo ocasionar la muerte del tejido afectado si resulta de suficiente intensidad (Opie, 2004). Diversos

autores han descrito las consecuencias bioquímicas de la isquemia miocárdica y los trastornos electrofisiológicos derivados de estas alteraciones que van a generar en el tejido isquémico unas condiciones favorables para el desencadenamiento de arritmias por reentrada. Destacamos la ya clásica revisión realizada por Edward Carmeliet (1999) que expondremos resumidamente junto a adicionales estudios originales y de revisión:

En condiciones de normal perfusión, el  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y el  $\text{FADH}_2$  formados durante la glucólisis y ciclo del ácido cítrico transfieren sus electrones al  $\text{O}_2$  a través de la cadena de transporte electrónico para generar la energía con la que se mantiene el gradiente quimiosmótico necesario para la síntesis de ATP. Por lo tanto, cuando el nivel de oxígeno en el citosol cae por debajo de un umbral crítico, se detiene la mencionada cadena de transporte, y junto a ella, el proceso de extrusión de protones en el interior de la mitocondria. En el tejido miocárdico isquémico, esta reducción del metabolismo oxidativo favorece la glucólisis anaerobia y el consiguiente acúmulo de lactato e hidrogeniones que puede llevar a una reducción en el pH intracelular de hasta una unidad en los primeros 10 minutos (Kirkels *et al.*, 1989). Reimer *et al.* (1981), observaron que alrededor de los 20 primeros segundos ya se detenía la respiración mitocondrial y se ponía en marcha la glucólisis anaerobia dando lugar a una cantidad limitada de ATP. Establecieron una correlación entre los niveles de fosfatos de alta energía y el daño miocárdico producido por la isquemia y describieron daños en membrana junto a alteraciones en funciones celulares integradas a partir de concentraciones tisulares de ATP inferiores a  $2 \mu\text{mol/g}$ . En estudios posteriores establecieron que estos cambios en la

## 1. Introducción

concentración de ATP comienzan prematuramente. Griese *et al.* (1988), establecieron una tasa de recambio para los fosfatos de alta energía de 31 a 40 moles/gramo de tejido húmedo/minuto. Teniendo en cuenta que la capacidad de almacenamiento no excede los 15 moles/gramo de tejido húmedo/minuto se puede deducir que bastan 30 o 40 segundos de isquemia para agotar las reservas de ATP. Sin embargo, existen diferentes mecanismos mediante los cuales el tejido isquémico es capaz de garantizar, al menos en una primera fase tras el cese de la perfusión, unas concentraciones mínimas de adenosín-trifosfato (ATP) cruciales para frenar el deterioro tisular:

En primer lugar, se ha descrito el fenómeno de hibernación, a través del cual se reducirían los requerimientos energéticos mediante la inhibición del proceso contráctil. Este fenómeno empieza a apreciarse alrededor de 30 segundos tras el cese de la perfusión coronaria y representa un considerable ahorro energético que permite la redistribución de los sustratos de alta energía disponibles para su utilización en procesos tales como el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial o la inhibición de reacciones irreversibles que conducen a la muerte celular (Piper *et al.* 1994). Existe, además, en esta primera fase, una vía de reposición de ATP condicionada por la reacción de equilibrio:  $ATP + creatina \rightleftharpoons ADP + \text{fosfocreatina}$  y catalizada por la enzima creatinfosfoquinasa (CPK) que también va a contribuir a la viabilidad celular en los primeros minutos de la isquemia. Otros procesos como el incremento de la glucogenolisis a causa de la activación de la enzima glucogenolítica, glucógeno fosforilasa, o la descarga simpática asociada a la respuesta isquémica, que a través de la liberación de noradrenalina va a facilitar los procesos de captación y

utilización de glucosa en las células miocárdicas, contribuyen también al mantenimiento de estas mínimas concentraciones de ATP durante un cierto intervalo de tiempo.

El cambio metabólico que supone la instauración de la glucólisis anaerobia a través de la activación de las enzimas fosfofructoquinasa, piruvatoquinasa y hexoquinasa, implica la formación de una importante cantidad de ácido láctico, lo que, si bien puede facilitar la síntesis de una cierta cantidad de ATP, terminará por frenar dicha ruta metabólica, reduciendo drásticamente la producción de fosfatos de alta energía (Carmeliet, 1999). La caída del ATP acaba teniendo consecuencias deletéreas sobre los sistemas de transporte activo que afectan a las concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana provocando cambios en las propiedades electrofisiológicas de los miocitos que van a contribuir de forma determinante en el desencadenamiento de las arritmias que se producen durante la isquemia aguda.

#### 1.2.2.2. Modificaciones de las concentraciones de iones: $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{H}^+$ .

En la figura 1.5 puede observarse una tabla resumen donde se aprecia la distribución asimétrica normal de los principales iones a ambos lados de la membrana de una célula miocárdica de trabajo. Durante la agresión isquémica se produce una alteración de estas concentraciones iónicas relativas, hecho que condiciona alteraciones electrofisiológicas características que trataremos de resumir a continuación: casi de forma inmediata se produce un aumento significativo de la concentración extracelular de  $\text{K}^+$  (Harris, 1966).

## 1. Introducción

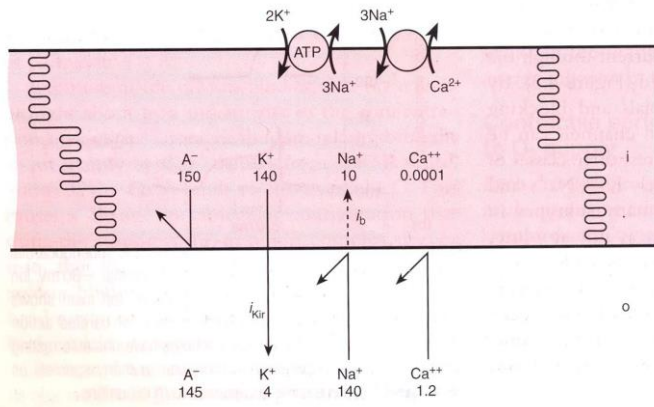
	Intracellular (mM)	Extracellular (mM)	Nernst equilibrium potential (mV)
K <sup>+</sup>	140	4	-94
Na <sup>+</sup>	10	140	+70
Ca <sup>2+</sup>	0.0001 <sup>a</sup>	1.2 <sup>c</sup>	+124
Cl <sup>-</sup>	30	120	-37 <sup>b</sup>
pH	7.0-7.1	7.4	-

**Figura 1.5.** Concentraciones iónicas de los principales iones a ambos lados de la membrana de una célula miocárdica de trabajo y su potencial de equilibrio de Nerst. (Modificado de Levick, 2010).

Muchos trabajos han tratado de analizar y caracterizar este fenómeno. Así, Kléber (1984) observó que la  $[K^+]_o$  prácticamente se duplicaba tras 5 minutos de oclusión coronaria, llegando a multiplicarse por 4 o 5 veces durante los 15 primeros minutos. Sin embargo, el mecanismo a través del cual se produce esta fuga de potasio ha sido tradicionalmente objeto de grandes controversias (Billman, 1994). Para algunos autores, la reducción en la actividad de la bomba  $Na^+K^+$  tendría un papel fundamental (Allen y Orchard, 1987). El agotamiento de las reservas de ATP provoca una caída del gradiente electroquímico generado por este intercambiador a valores inferiores a los 50 kJ/mol (Cascio, 2001; citado por Zaitsev *et al.*, 2003). Como es sabido, la bomba  $Na^+K^+$  transporta, contra gradiente de concentraciones, 3 iones  $Na^+$  desde el interior celular hacia el espacio extracelular acoplando al mencionado transporte la entrada de 2 iones  $K^+$ . De este modo, este sistema de intercambio con actividad ATP-asa genera un flujo neto de cargas positivas hacia el exterior celular contribuyendo, gracias a su actividad electrogénica, al mantenimiento del potencial de reposo. La



reducción de su actividad durante la isquemia contribuiría a la rápida acumulación de  $K^+$  en el espacio extracelular. Otros factores podrían contribuir, como la falta de lavado debida a la estasis circulatoria, o un aumento de la permeabilidad al  $K^+$  de la membrana celular afectada por la isquemia (Yan *et al.*, 1993). También las corrientes de potasio dependientes de ligando *IKAA* (ácido araquidónico) o asociadas a la extrusión de los ácidos débiles, como el lactato, formados en las células durante el metabolismo anaerobio (Kléber, 1984). Sin embargo, desde que Noma (1983) descubriera la corriente producida por la activación de los canales de potasio dependientes de ATP, objeto de estudio de este trabajo de investigación, se ha generado una fuerte evidencia científica de que la acumulación extracelular de potasio inducida por la isquemia es consecuencia, en gran medida, de la apertura de estos canales.



**Figura 1.6.** Gradientes iónicos, corrientes, bombas e intercambiadores contribuyentes al potencial de membrana en reposo (Modificado de Levick, 2010).

## 1. Introducción

Si bien es cierto que su activación durante la isquemia es importante para la prolongación de la vida celular y la preservación funcional, también es cierto que la fuga de potasio no se produce de forma homogénea en todo el territorio afectado lo que puede contribuir al incremento de la heterogeneidad y al establecimiento de unas condiciones que podrían promover la propia FV (Billman, 1994).

Por otra parte, se ha descrito un aumento del sodio intracelular ( $[Na^+]_i$ ) que también duplicaría su concentración normal llegando a valores de alrededor de 20 mM. La disminución de la actividad de la bomba  $Na^+-K^+$  estaría implicada también en este fenómeno que se vería agravado por la activación del intercambiador  $Na^+-H^+$  a causa del aumento en la concentración citosólica de hidrogeniones secundario al metabolismo anaeróbico de la glucosa. A su vez, este incremento de la concentración intracelular de sodio va a provocar un aumento de la concentración intracelular de calcio debido a que el intercambiador  $3Na^+/Ca^{2+}$  comienza a actuar en su forma reversa, hecho que promueve un flujo neto de cargas positivas hacia el interior del miocito y la despolarización parcial del potencial de membrana que puede propiciar la génesis de post-despolarizaciones tempranas y tardías implicadas en la mayoría de las arritmias características de la isquemia miocárdica. La inhibición de la actividad de la bomba  $Ca^{2+}$ -ATPasa contribuye también a la sobrecarga de este ion durante la diástole, produciendo efectos deletéreos al activar enzimas como las fosfolipasas, que producen un acumulo de sustancias como la lisofosfatidilcolina que, probablemente debido a su carácter anfifílico, interaccionan con la membrana y el citoesqueleto contribuyendo a agravar estos efectos arritmogénicos (Opie, 2004).

1.2.2.3. Modificaciones electrofisiológicas en la isquemia aguda.

En relación a las alteraciones electrofisiológicas que produce la isquemia miocárdica y que se encuentran directamente relacionadas con el desencadenamiento de arritmias que amenazan la vida, como la fibrilación ventricular, y en las que subyacen fenómenos de reentrada, comentaremos de forma somera algunas de las principales (Carmeliet, 1999, Sutton, 2000, Billman, 2008):

La interrupción del flujo coronario origina rápidamente (durante los tres primeros minutos) una despolarización del potencial de reposo normal (-85 mV) a valores cercanos a los -60 mV. Este hecho origina un ligero aumento inicial de la excitabilidad, debido al acercamiento al potencial umbral, que sin embargo se revierte posteriormente coincidiendo con un escape de potasio al exterior de la célula que deja hiperpolarizadas a las células isquémicas. Se produce también una disminución de la pendiente de ascenso en la fase de despolarización inicial del potencial de acción, debida a la inactivación parcial de los canales de Na<sup>+</sup> que se produce a potenciales tan *positivos*, y por tanto, una disminución de la excitabilidad que tras dos minutos de isquemia va a afectar gradualmente también a la conducción. El proceso de activación de los ventrículos que normalmente requiere alrededor de 80-100 ms puede llegar a retrasarse hasta los 200-300 ms. Además, en los primeros instantes, se produce una alteración característica sobre la duración del potencial de acción. Inicialmente se prolonga ligeramente, dando paso a continuación, a un a un acortamiento significativo del mismo. También es típico de la isquemia que tras los potenciales de acción acortados sobrevengan largos periodos refractarios efectivos, lo

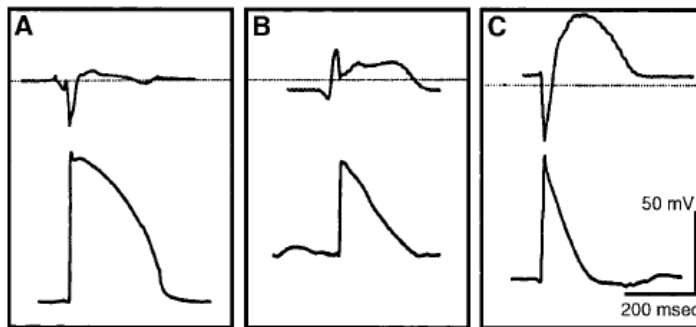
## 1. Introducción

que ha sido descrito por diversos autores (Sutton *et al.*, 2000), por lo que la modificación de estos dos parámetros se da en sentidos opuestos. En la zona situada entre el miocardio sano y el más afectado por la isquemia se acortan, tanto el período refractario efectivo como la duración del potencial de acción. En la parte isquémica la excitabilidad se halla aumentada. La razón de que en la parte no isquémica la excitabilidad se halle también aumentada se debe a la corriente de lesión, que tiene un efecto despolarizante. Tras 15-20 minutos las células que se encuentran en la zona central del infarto pueden recuperar temporalmente su excitabilidad aunque la pendiente del potencial de acción y la amplitud continúen deprimidas, lo que se halla en relación con una liberación masiva de catecolaminas y con la apertura de la circulación colateral que va facilitar mediante el “lavado” una ligera disminución en la  $[K^+]_o$ . Alrededor de los 30 minutos de isquemia, si bien los cardiomiocitos continúan despolarizándose, la conducción del potencial de acción se bloquea completamente.

La dispersión de la refractariedad y otras propiedades fisiológicas existe en condiciones fisiológicas normales; de hecho, hay gradientes en la duración del potencial de acción entre el epicardio y el endocardio, entre el ápex y la base, y entre el ventrículo derecho y el izquierdo. Sabemos que el miocardio es un sincitio funcional, pero no es absolutamente homogéneo desde el punto de vista electrofisiológico. Existe falta de continuidad y falta de homogeneidad en el mismo, tanto a nivel estructural, como desde el punto de vista de las propiedades eléctricas de la membrana, lo que se agrava ostensiblemente en situaciones patológicas, como es el caso de la isquemia. Este incremento de heterogeneidad es responsable de la aparición de

dispersión espacial de la repolarización, bloqueos en la conducción (Kléber y Rudy, 2004) y fenómenos de reentrada. En la zona borde endocárdica, la corriente de lesión puede afectar al sistema de Purkinje haciendo que la actividad espontánea enmascarada se vuelva evidente.

En la figura 1.7 podemos apreciar alguno de los efectos electrofisiológicos característicos de la isquemia y su traducción al electrocardiograma:



**Figura 1.7.** Electrocardiogramas y potencial de acción registrados en corazón de cerdo al principio del periodo isquémico (A), tras 12 minutos del mismo (B) y durante la perfusión (C). Adaptado de Carmeliet, 1999.

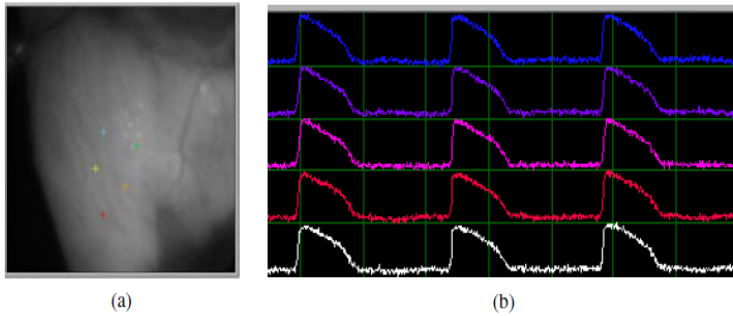
Encontramos, a) una depresión inicial del segmento T-Q como expresión de la disminución del potencial de reposo en zona isquémica; b) Una elevación del segmento S-T; c) Ensanchamiento del complejo QRS y retraso de la deflexión intrínseca. En la zona central necrosada el electrocardiograma muestra morfologías monofásicas. La activación local se recupera transitoriamente, lo que a veces produce alternancia de la onda T.

## 1. Introducción

Cuando se produce una reperfusión antes de los 30 minutos de isquemia, las células se hiperpolarizan rápidamente mientras que los potenciales de acción se vuelven temporalmente muy cortos. Se da asimismo una marcada heterogeneidad tanto en la duración del potencial de acción como en los periodos refractarios efectivos. Aunque la excitabilidad está deprimida puede aparecer actividad espontánea, probablemente como consecuencia de post-despolarizaciones tardías, y cuando los potenciales de acción se alargan, también a causa de las post despolarizaciones tempranas. Asimismo, como comentaremos más adelante, durante el proceso isquémico se origina una depresión de la velocidad de conducción de los potenciales de acción, fenómeno que también contribuirá al incremento de la arritmogénesis.

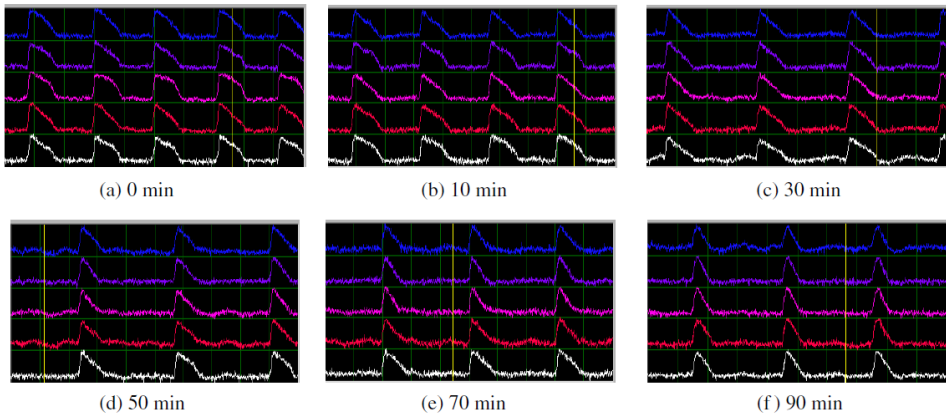
Yang *et al.*, (2007), usando tintes sensibles a voltaje (di-4-ANEPPS) para el desarrollo de técnicas de mapeo óptico de la actividad eléctrica, confirmaron los mencionados cambios electrofisiológicos asociados a la isquemia aguda. En un modelo de corazón aislado de conejo encontraron decrementos en la frecuencia de activación eléctrica durante la fibrilación ventricular y de la velocidad de conducción, así como un incremento en la refractariedad.

La figura 1.8 muestra un ejemplo de la preparación experimental y el registro de los potenciales de acción en cinco puntos arbitrarios de mapeo antes de la isquemia. Tras un periodo de estabilización de la preparación experimental, se llevó a cabo una reducción rápida de la perfusión para producir las condiciones de isquemia global aguda y se procedió a la monitorización continua de las variaciones electrofisiológicas asociadas a la misma.



**Figura 1.8.** Preparación experimental (a) y registros de los potenciales de acción en situación control (b). Yang *et al.*, 2007.

La figura 1.9 muestra la evolución de los registros durante una hora y media de la preparación sometida a una rápida reducción del flujo para reproducir las condiciones de isquemia global. Se observa un progresivo acortamiento de la duración de los potenciales de acción de las células isquémicas acompañada de una desaparición también progresiva de la meseta, así como una disminución de la amplitud y la pendiente de ascenso correspondiente a la despolarización ventricular.



**Figura 1.9.** Registros ópticos en diferentes periodos de isquemia. Yang *et al* 2007.

## 1. Introducción

En relación a los mecanismos subyacentes a los cambios electrofisiológicos durante la isquemia y reperfusión, comentaremos lo que sigue: los posibles mecanismos implicados en la despolarización, en reposo, que se da durante la isquemia son el aumento en la concentración extracelular de potasio y la existencia simultánea de una corriente hacia el interior de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ .

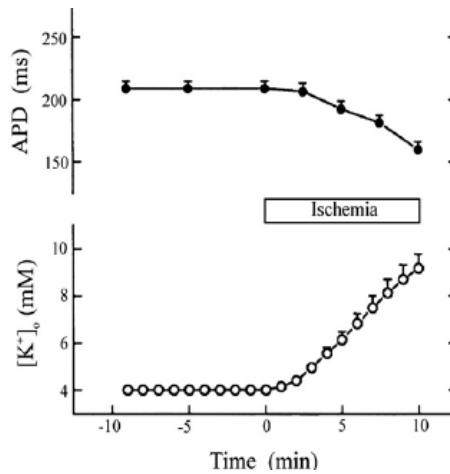
La disminución, tanto de la pendiente de ascenso del potencial de acción como de la amplitud del mismo, se debe a una menor entrada de  $\text{Na}^+$  (probablemente debida a la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  por la caída del potencial de reposo, así como por la acción sobre el mencionado canal, de sustancias anfifílicas como son la lisofosfatidil colina y los acilcarnitina de cadena larga, de ácidos grasos, de estrés oxidativo y de la acidosis y el aumento simultáneo de corrientes hacia el exterior que provoca un efecto de cortocircuito. La entrada de  $\text{Na}^+$  se reduce posteriormente todavía más por una caída en el gradiente químico debido principalmente al aumento de la concentración intracelular de sodio  $[\text{Na}^+]_i$ . En una etapa más tardía (15 minutos) aumenta mucho la resistencia celular longitudinal, resultando en una marcada caída de la conducción.

El acortamiento de la duración del potencial de acción (previamente aumentada quizá por una disminución regional de la temperatura y/o a una modificación de la actividad electrogénica de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , a una disminución en la corriente  $I_{K1}$  como consecuencia del acúmulo de protones, o la inhibición aguda de  $I_{to}$ ), se debe principalmente a la aparición de corrientes repolarizantes que se activan a potenciales positivos propios de la fase de meseta y que en



condiciones fisiológicas no se expresan. Estas corrientes, que sólo participan en la génesis del potencial de acción durante la isquemia, son en su mayoría flujos de  $K^+$  y  $Cl^-$ . Cabe destacar el papel de  $I_{KATP}$ ,  $I_{KNa}$  e  $I_{KAA}$ .

Datos aportados por Weiss *et al.*, en un estudio publicado en 1992, demostraron que existía una relación temporal entre el detrimento de la duración del PA y el acumulo de  $K^+$  extracelular en tabiques interventriculares aislados de conejo (para revisión ver Billman, 2008; figura 1.10). Asimismo parece contribuir, debido a una acción adrenérgica beta, (y otros factores como la edematización osmótica, el estiramiento mecánico, etc) la activación de los canales de  $Cl^-$ .



**Figura 1.10.** Relación temporal entre el acortamiento del PA y la salida de  $K^+$  durante la isquemia (Weiss *et al.*, 1992; Tomado de Billman, 2008).

Es de destacar que el acortamiento de la duración del potencial de acción en la zona limítrofe situada entre el miocardio necrosado y el

## 1. Introducción

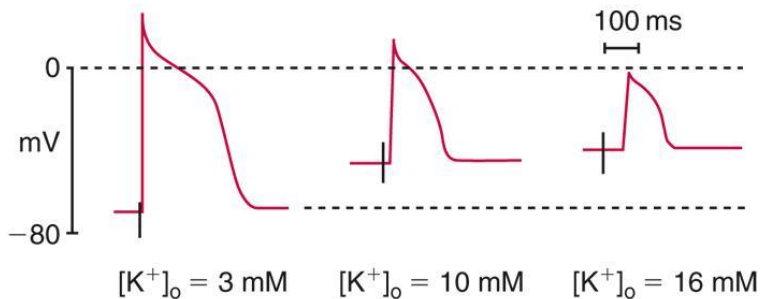
tejido no afectado por la lesión isquémica, se debe principalmente a la “corriente de lesión” generada por la diferencia de potencial entre el miocardio isquémico y el normóxico, más que a los cambios que se producen en la conductancia iónica. La corriente de lesión que reduce ligeramente el potencial de reposo ( $E_m$ ) invierte la dirección durante la actividad y aumenta la tasa de repolarización.

En relación con los cambios de la refractariedad, parece ser que la prolongación de la misma en la zona afectada por el daño isquémico se halla relacionada con un incremento del tiempo de repolarización a partir de la inactivación de los canales de sodio debida a la acidosis, a la formación de lisofosfatidilcolina y de acilcarnitinas de cadena larga, a productos derivados del estrés oxidativo, y a la apertura de los canales de  $K^+$  y  $Cl^-$  y su efecto de cortocircuito.

Paradójicamente tanto la duración del potencial de acción como de la refractariedad, en la llamada zona limítrofe entre la isquémica y la sana, además de la marcada dispersión de estos parámetros, estos se acortan. En esto último parece influir la corriente de lesión. Como es sabido, la dispersión en el PRE, que aumenta con la activación simpática, es una condición favorece la aparición de arritmias por reentrada (Han y Moe, 1964).

Como antes hemos comentado, durante la isquemia también se deprime la velocidad de conducción. El incremento extracelular de  $[K^+]$ , secundaria a la activación de estas corrientes durante el proceso isquémico y a la falta de “lavado” debida a la estasis circulatoria, reduce el potencial de equilibrio de Nernst para el potasio y de ese modo el potencial de reposo de membrana de los miocitos. Este hecho es

determinante en la disminución de la amplitud y de la pendiente de ascenso del potencial de acción (fase 0) característica de la isquemia. Como se ha comentado con anterioridad, a potenciales tan *positivos*, muchos canales de  $\text{Na}^+$  permanecen en estado inactivo (a un potencial de reposo de  $-70$  mV alrededor de la mitad de las compuertas de inactivación se encuentran cerradas) lo que atenúa la corriente rápida de sodio ( $I_{\text{Na}^+}$ ), responsable del rápido ascenso de la fase 0 del potencial de acción durante la despolarización celular. La velocidad de conducción del impulso eléctrico a través del tejido cardiaco depende en gran medida de la magnitud y rapidez de ascenso de los potenciales ya que estos van a generar la corriente necesaria para la propagación de la excitación. En la figura 1.11 observamos el efecto que exhibe el incremento de la concentración extracelular de  $\text{K}^+$  sobre el potencial de reposo, sobre la duración del potencial de acción y la amplitud del mismo y sobre la velocidad de conducción del impulso eléctrico.



**Figura 1.11.** Efecto de distintos grados de hiperkalemia sobre el potencial de membrana en una fibra de Purkinje: aumento del tiempo de conducción (la espiga a la izquierda del PA marca estimulación externa), disminución del potencial de reposo, reducción de la amplitud del potencial de acción y de su pendiente de ascenso (Modificado de Levick, 2010).

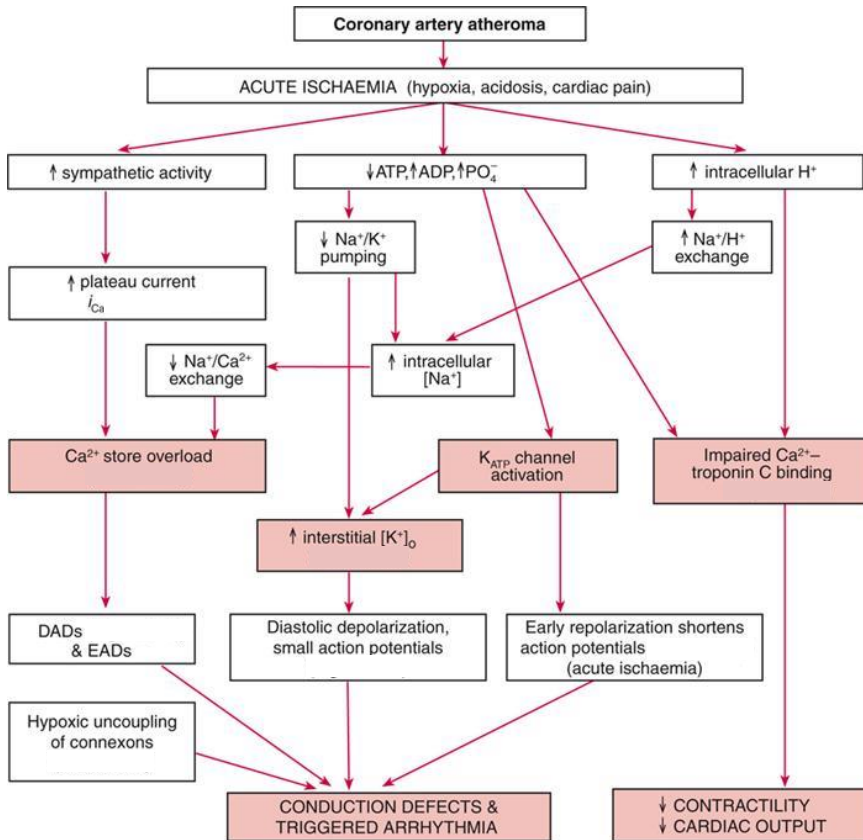
## 1. Introducción

La propagación de la excitación también es dependiente de la arquitectura tisular que va a determinar las propiedades pasivas que condicionan la transmisión eléctrica como la resistencia de la membrana celular, la resistencia celular, longitudinal y transversal, así como la resistencia eléctrica que ofrece el compartimento extracelular.

Durante la isquemia también se ven afectadas todas estas propiedades afectando negativamente a la velocidad de conducción. En los primeros instantes, la resistencia extracelular aumenta considerablemente en parte debido al colapso de la red vascular y al edema que sufren los cardiomiocitos. En una etapa más tardía (15 minutos) se produce una afectación a nivel de acoplamiento, célula a célula, cuando se ve comprometida la funcionalidad de muchas uniones en hendidura, pese a que curiosamente, éstas tienen un papel especialmente importante en la necrosis del tejido, a través de un proceso en el que una célula “mata a otra” precisamente debido a la fuga de calcio que se produce por estas comunicaciones intercelulares (García-Dorado *et al.*, 2004).

El bloqueo de las *gap junctions*, que aumenta dramáticamente la resistencia longitudinal celular, no se produce de manera homogénea a lo largo del tejido isquémico y va contribuir, junto a la dispersión espacial de los periodos refractarios, a la generación de un sustrato favorable para la aparición de arritmias por reentrada.

En la figura 1.12 se resumen algunos de los efectos cardíacos causados por la isquemia.



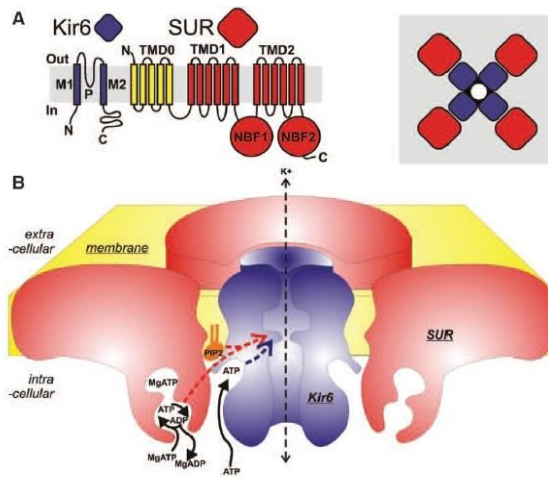
**Figura 1.12.** Esquema resumen de los múltiples mecanismos a través de los cuales la isquemia miocárdica provoca alteraciones en la contractilidad y en la arritmogénesis. (Modificado de Levick, 2010).

### 1.2.3. Estudio especial de la participación del canal KATP en las modificaciones electrofisiológicas por la isquemia aguda.

El canal de potasio ATP-dependiente (KATP) fue descubierto y descrito por primera vez en 1983 por Akinori Noma cuando trabajaba en parches de membrana aislada procedentes de miocitos ventriculares de cobaya (Noma, 1983). Los canales KATP (figuras 1.13, 1.14 y 1.15)

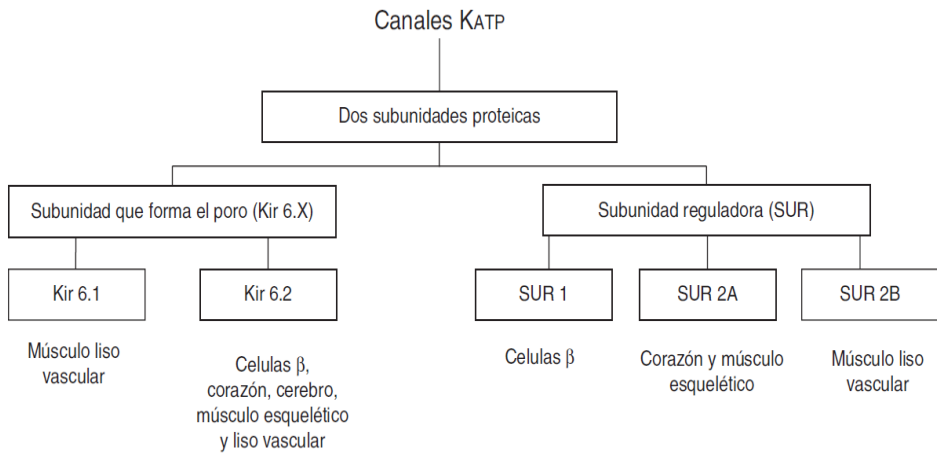
## 1. Introducción

son hetero-octámeros compuesto por cuatro subunidades del receptor de las sulfonilureas (SURx), que actuarían como subunidades reguladoras, a las que se uniría el ATP intracelular bloqueándolo, y cuatro subunidades Kir6.x, proteínas de la familia de los rectificadores internos de potasio, que conformarían el poro del canal, en una relación 1:1 (Hibino *et al.*, 2010).



**Figura 1.13.** Componentes moleculares de los canales KATP. Tomado de Nichols *et al.*, (2013).

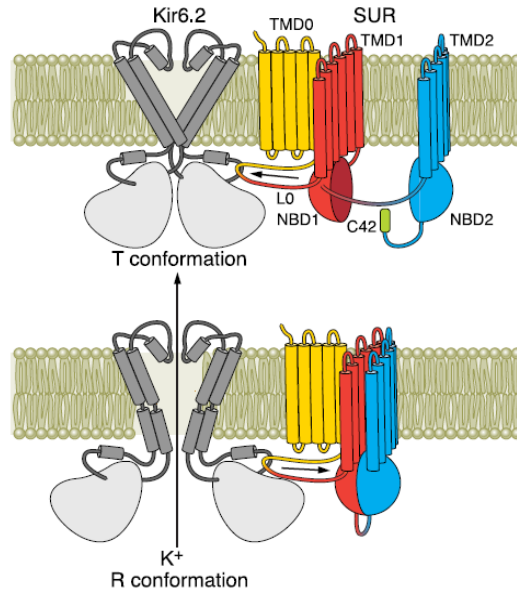
La combinación de las diferentes subunidades SUR y Kir dan lugar a los distintos tipos de canales KATP encontrados en las diferentes localizaciones anatómicas (figura 1.14). Se ha confirmado su presencia en gran variedad de tejidos y células excitables incluyendo neuronas del sistema nervioso central (Ashcroft *et al.*, 1990), músculo esquelético (Spruce *et al.*, 1985) y liso (Standen *et al.*, 1989), epitelio renal y traqueal, y en el páncreas, donde actúan como moduladores de la liberación de insulina por las células beta pancreáticas (Cook y Hales, 1984).



**Figura 1.14.** Combinación de diferentes subunidades SUR y Kir dan lugar a los distintos tipos de canales KATP en diferentes localizaciones anatómicas (Tamayo, 2007).

En el miocardio, los canales KATP se encuentran localizados en el sarcolema y en las membranas internas mitocondriales y se componen principalmente de la combinación de las subunidades SUR2A y Kir6.2 (para revisión ver Flagg, 2010). Deben su nombre a la regulación inhibitoria que ejerce la concentración fisiológica de ATP intracelular. El descenso del ratio ATP/ADP citosólico que se da en situaciones de estrés metabólico (Vajda *et al.*, 2007) favorece su apertura, de modo que la actividad del canal dependería de la concentración de fosfatos de alta energía existente en el cardiomiocito. Permiten acoplar los requerimientos metabólicos celulares a la actividad eléctrica al detectar modificaciones en los niveles de ATP y adenosina bifosfato de magnesio (Li y Dong, 2010). Regulan, por tanto, la actividad eléctrica de la membrana plasmática ajustando el potencial de reposo y modulando la duración del potencial de acción, desempeñando un papel fundamental en multitud de procesos fisiológicos (Tamayo, 2007).

## 1. Introducción

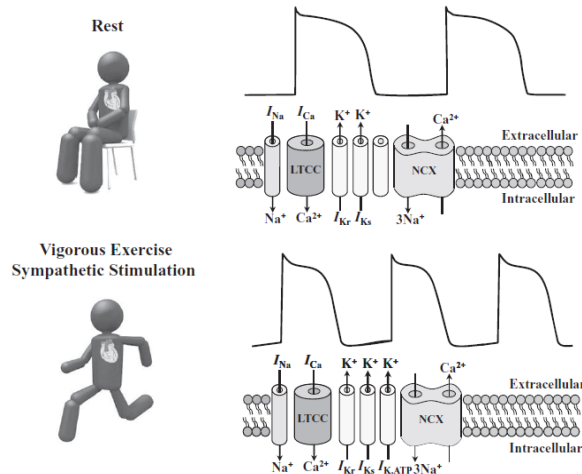


**Figura 1.15.** Modelo de apertura y cierre del canal de potasio SUR2x/Kir6.2 cardiaco basado en el cambio conformacional de la subunidad SUR2x (de Yamada *et al.*, 2004, tomado de Hibino *et al.*, 2010).

Otro factor regulador de los canales K<sub>ATP</sub> es el pH, que hace que puedan ser activados, incluso bajo condiciones fisiológicas, cuando se produce un aumento de la demanda metabólica. El incremento de la frecuencia cardíaca y la contractilidad miocárdica propiciado durante la activación simpática resulta en una mayor demanda de oxígeno. La producción de energía anaeróbica en el corazón durante la realización de ejercicio físico intenso favorece la acumulación de lactato. Se ha publicado que el lactato intracelular puede activar las canales sarcK<sub>ATP</sub> en células ventriculares de cobaya y conejo (Edmund y Qian, 1991; Jin *et al.*, 1993), e investigaciones en corazones humanos (Nakaya, 2014) apuntan a que el acortamiento de la duración del potencial de acción durante la realización de ejercicio intenso y la estimulación simpática



podría ser debido, al menos en parte, a la activación de los KATP sarcolemales (Figura 1.16).



**Figura 1.16.** Relación entre el canal KATP y el potencial de acción en situación de reposo y durante ejercicio intenso (Nakaya, 2014).

Como se ha comentado, existe una fuerte evidencia de que la acumulación extracelular de potasio y la reducción de la duración del PA inducidos por la isquemia es resultado, en gran medida, de la apertura de canales KATP (Billman, 1994; y Billman, 2008). La apertura de los canales eleva rápidamente la concentración extracelular de potasio provocando la despolarización del tejido circundante y el acortamiento de la duración del potencial de acción. Los efectos protectores estarían asociados a este acortamiento del PA que incrementaría la viabilidad celular durante los periodos de isquemia al reducirse la sobrecarga intracelular de  $Ca^{2+}$  (Golbidi y Laher, 2012). La salida de potasio al espacio extracelular que facilita la apertura de estos

## 1. Introducción

canales tiene un importante efecto repolarizante que acorta la duración del potencial de acción cardiaco y reduce la fase de meseta, inhibiendo  $I_{CaL}$ , por lo que se evitaría la sobrecarga intracelular de  $Ca^{2+}$  (Noma, 1983). Al reducirse el influjo de  $Ca^{2+}$ , las reservas de ATP, que de otro modo serían utilizadas por la célula en los procesos contráctiles y para abastecer a las bombas e intercambiadores con los que reestablecer las concentraciones fisiológicas del ion, se preservan. Por otro lado, la sobrecarga de calcio puede conducir a la muerte celular por necrosis y apoptosis por lo que la activación de los canales  $sarcK_{ATP}$ , en efecto, podría constituir un mecanismo cardioprotector desarrollado para afrontar las agresiones isquémicas.

Sin embargo, hay que recordar que la activación de la corriente  $I_{KATP}$  se acompaña de una marcada dispersión de la repolarización y de la refractariedad miocárdicas, siendo esta una condición básica sobre la que se desarrollan las arritmias por reentrada (Di Diego y Antzelevitch, 1993; Billman, 2008). Si bien es cierto que la activación del canal que vehicula la corriente citada es importante para la prolongación de la vida celular y preservación funcional, no lo es menos que la activación de este canal produce, como acabamos de comentar, un acortamiento de la refractariedad y del potencial de acción, lo que si se produce inhomogéneamente podría promover la arritmogénesis. El incremento en los niveles de potasio extracelular produce, un efecto despolarizante, indirectamente, una inactivación de los canales de  $Na^+$  y la despolarización celular, reduciendo la amplitud y duración del PA y por tanto una disminución de la excitabilidad y el bloqueo de la conducción.

**1.2.4. Efectos protectores del ejercicio físico crónico sobre las consecuencias electrofisiológicas miocárdicas de la isquemia aguda: Implicación del canal KATP.**

1.2.4.1. Dinámica del canal KATP en la isquemia aguda del miocardio y su relación con el efecto protector del ejercicio físico.

Se ha demostrado, a través de diversos estudios epidemiológicos, que el ejercicio físico regular reduce el riesgo de muerte durante la agresión isquémica miocárdica (Paffenbarger y Hale, 1975; Hertzeanu *et al.*, 1993). También se ha descrito una reducción de la incidencia de muerte súbita en pacientes con historia previa de infarto de miocardio, tratados utilizando protocolos de ejercicio físico (Berlin y Colditz, 1990).

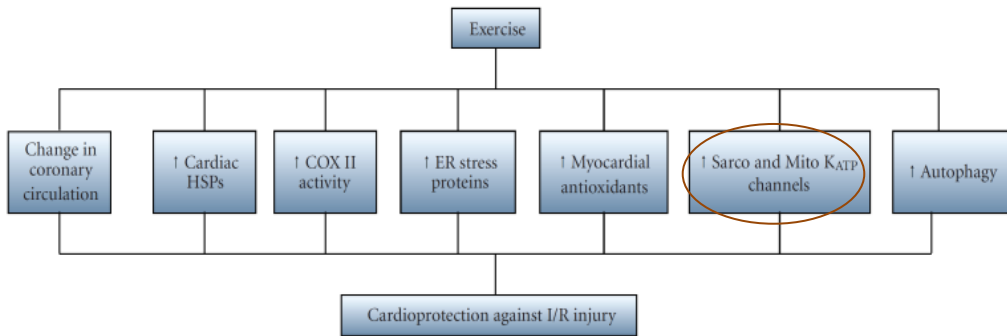
Los mecanismos que intervendrían en la cardioprotección mediada por el ejercicio durante la isquemia han sido objeto de profusa investigación. Entre ellos encontramos la mejora en la circulación coronaria (Brown *et al.*, 2003), el aumento de los niveles de proteínas de choque térmico (Harris y Starnes, 2001; Demirel *et al.*, 2003; Such *et al.*, 2008), la mejora en la capacidad antioxidante cardiaca (Ramires y Ji, 2001; Quindry *et al.*, 2010), la activación de la proteincinasa-C (Yamashita *et al.*, 2001), cambios en las proteínas reguladoras del calcio (Lujan *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2005), sensibilidad reducida a la apertura del poro de transición mitocondrial inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Marcil *et al.*, 2005), y/o la reducción de factores que modifican el consumo de oxígeno como la frecuencia cardiaca (Billman y Kukielka, 2007).

## 1. Introducción

Las evidencias recientes revelan que la elevada actividad de la enzima superóxido dismutasa (MnSOD) miocárdica también jugaría un papel importante en la cardioprotección inducida por el entrenamiento (Powers *et al.*, 2008). Asimismo, ha sido documentado que el aumento en la producción de óxido nítrico por una actividad incrementada de la óxido nítrico sintetasa endotelial inducida por el ejercicio también intervendría. Además, también ha sido propuesto que el efecto cardioprotector del ejercicio físico crónico podría estar relacionado con modificaciones del equilibrio existente en el sistema nervioso autónomo, entre las ramas simpática y parasimpática, en favor de esta última, dadas las investigaciones en las que al aumentar la actividad parasimpática se obtiene un efecto protector (Zuanetti *et al.*, 1987; Billman, 1990). No obstante y a pesar de las anteriores consideraciones, en opinión de un número importante de autores, en la actualidad aún están por dilucidar los mecanismos exactos por los que el entrenamiento físico exhibe un efecto protector frente a la muerte súbita cardíaca (Hamer y Stamatakis, 2008).

Son numerosas las investigaciones que se han llevado a cabo tratando de dilucidar la participación del canal de potasio sensible al ATP en los efectos protectores del ejercicio físico crónico. Desde hace aproximadamente una década se han desarrollado investigaciones dirigidas a conocer si el efecto del ejercicio podría modificar de alguna manera la corriente *IKATP* en el corazón isquémico (Jew y Moore, 2002; Powers *et al.*, 2008; Quindry *et al.*, 2012) y si ello podría relacionarse con el efecto protector del mismo. La mayoría de investigadores sostienen la hipótesis de que el entrenamiento físico induciría una sobreexpresión de estos canales que facilitarían la corriente

$I/KATP$  durante la isquemia miocárdica confiriendo cardioprotección al miocardio isquémico a través de los mecanismos de ahorro energético que hemos comentado (figura 1.17).

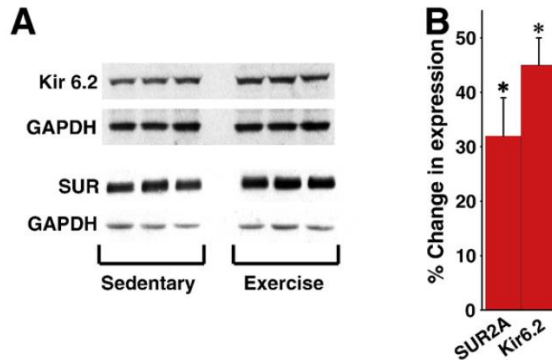


**Figura 1.17.** Mecanismos propuestos de cardioprotección durante los procesos de isquemia-reperfusión (modificado de Golbidi y Laher, 2012).

Estudios en ratones genéticamente modificados ( $Kir\ 6.2^{-/-}$ ) han mostrado que los canales  $KATP$  son necesarios para la adaptación del corazón al ejercicio vigoroso. En el estudio llevado a por Zingman *et al.*, (2002), los animales modificados, que carecían de la subunidad conformadora del canal, presentaron una menor tolerancia al estrés durante la estimulación simpática.

Posteriormente, como se puede apreciar en la figura 1.18, encontraron un incremento significativo en la expresión de subunidades  $Kir6.2$  y  $SUR2A$  en ventrículo de ratones entrenados y lo atribuyeron a la remodelación cardíaca inducida por el ejercicio que confería una mayor resistencia a la lesión isquémica a aquellos ratones que habían sido entrenados (Zingman *et al.*, 2011).

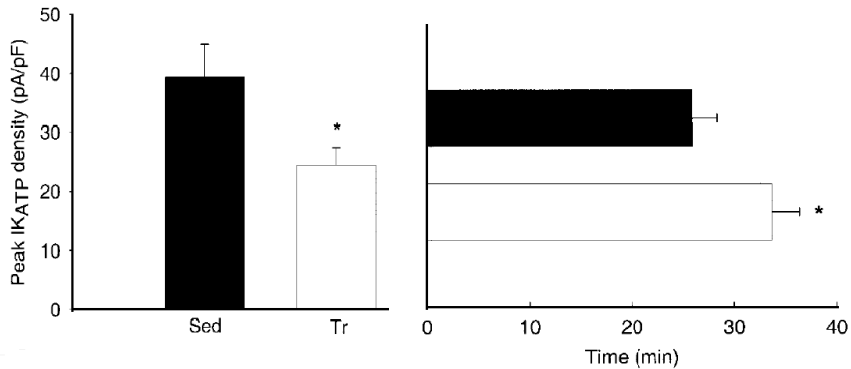
## 1. Introducción



**Figura 1.18:** incremento significativo de la expresión de subunidades Kir6.2 y SUR2A en ventrículo izquierdo de ratones entrenados (Zingman *et al.*, 2011).

A pesar de la evidencia descrita hasta el momento, hay una gran cantidad de autores que defienden que la apertura del canal KATP ejerce un efecto deletéreo, puesto que la salida de potasio no se produce de forma homogénea, fenómeno que promueve heterogeneidades en los procesos de repolarización y un demostrado efecto proarrítmico (Di Diego y Antzelevitch, 1993; ver revisiones de Billman, 2008 y Flagg *et al.*, 2010).

Por otra parte, Jew *et al.*, (2002), empleando técnicas de “patch-clamp”, investigaron el efecto del entrenamiento sobre las propiedades de la corriente vehiculada por los canales KATP en cardiomiocitos procedentes de animales entrenados y encontraron, contrariamente a lo expuesto hasta el momento, que la apertura de los canales se producía más tarde que en los controles y que además, el pico máximo de corriente era menor, evidenciando esta vez un efecto de bloqueo del canal derivado del entrenamiento (figura 1.19).



**Figura 1.19.** Pico de densidad de la corriente  $I_{K_{ATP}}$  inducida por la anoxia en cardiocitos de ratas entrenadas (Tr) y sedentarias (Sed). **Parte derecha:** tiempo para la expresión de la corriente  $I_{K_{ATP}}$  después de la anoxia. Cardiocitos en el grupo entrenado (barra blanca; n=26) expresaron  $I_{K_{ATP}}$  más tarde ( $p < 0,05$ ) que los cardiocitos en el grupo Sed (barra negra; n=28). Tomado de Jew *et al.*, 2002.

Observaciones realizadas por nuestro grupo (Soler *et al.*, 2014, del Canto *et al.*, 2012) tampoco parecen apoyar la idea de que el ejercicio físico ejerza su efecto protector a través de la apertura del mencionado canal, por lo que nos planteamos si los efectos electrofisiológicos beneficiosos del ejercicio físico crónico en el corazón isquémico, se pueden realmente relacionar, al menos en parte, con la activación  $I_{K_{ATP}}$ . Resulta difícil comprender que el ejercicio físico proteja a través de un efecto abridor del canal KATP o a través de efectos que determinen una mayor actividad de la corriente que vehicula si tenemos en cuenta que: el ejercicio físico crónico ha sido propuesto como maniobra protectora no farmacológica frente a ciertas arritmias (Billman, 2008) y que numerosos estudios científicos experimentales han demostrado el efecto arritmogénico de la apertura del canal KATP (Chi, 1990; Di Diego y Antzelevitch, 1993; Quintanilla *et al.*, 2013).

## 1. Introducción

Apoyando este último planteamiento se ha demostrado un efecto protector por parte de los fármacos que bloquean el canal KATP; para tales autores los fármacos que bloquean esta vía son agentes antiarrítmicos particularmente eficaces, y de hecho de tal modo se comportan (Farid *et al.*, 2011).

### 1.2.4.2. Aparentes controversias respecto a la participación del canal KATP en los efectos beneficiosos del ejercicio físico crónico.

Como hemos ya comentado en líneas anteriores, no parece explicarse bien el efecto protector antiarrítmico del ejercicio físico a través de la activación los canales KATP. Haciendo alusión a las publicaciones antes mencionadas de Del Canto *et al.*, (2012) y Soler *et al.*, (2014) comentaremos los resultados que, obtenidos en un modelo de corazón aislado sometido a isquemia regional aguda, y en los que se cuantificó la energía mínima necesaria para revertir el proceso fibrilatorio mediante la aplicación de choques eléctricos, se encontró que la energía necesaria para la desfibrilación de los corazones fue mayor en los corazones control que la requerida para revertir la arritmia en los corazones de los animales que habían sido entrenados y en aquellos que fueron tratados con glibenclamida. En un estudio posterior, desarrollado también en nuestro grupo de investigación, se administró pinacidil para evaluar el efecto de la apertura de los canales sobre el mismo parámetro y se pudo constatar que la energía necesaria para desfibrilar, una vez activada *I*KATP, fue muy superior consiguiéndose la vuelta a ritmo sinusal en un solo caso (Alves, 2015). Hay que decir no obstante, que si bien estos resultados reflejan una mayor estabilidad



eléctrica ventricular en los grupos glibenclamida y entrenado, el bloqueo los canales provocó la caída de la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular tras la oclusión arterial coronaria que puede reflejar signos deletéreos (Strohmenger *et al.*, 1997) asociados a deterioro metabólico del miocardio (Neumar *et al.*, 1990). Estas observaciones parecen coincidir con las de los autores que fundamentalmente se refieren al tamaño del infarto experimental y al efecto protector que supone la apertura del canal KATP al preservar recursos energéticos y efectivamente reducir el tamaño del área necrosada. Sin embargo, en aquellos procesos directamente ligados a la arritmogénesis, la apertura del canal se ha manifestado claramente proarrítmica en nuestras investigaciones, mientras que el bloqueo ha reproducido comportamientos electrofisiológicos acontecidos en el grupo de animales entrenados que reflejan una mayor estabilidad eléctrica y una menor propensión al desencadenamiento y mantenimiento de eventos arrítmicos que podría estar relacionada con la atenuación de la heterogeneidad espacio-temporal de la refractariedad miocárdica descrita previamente por otros autores (Vajda *et al.*, 2007; Farid *et al.*, 2011).

Como es sabido y ha sido demostrado, tanto de forma experimental como en la clínica, el ejercicio físico crónico ejerce un efecto protector e incluso ha sido propuesto como maniobra protectora no farmacológica frente a la instauración de determinadas arritmias, entre ellas la fibrilación ventricular (Billman, 2002). Se ha constatado en multitud de estudios experimentales que la realización de protocolos de ejercicio físico eleva el umbral de aparición de determinadas arritmias (Hull *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 2005; Lujan *et al.*, 2006) por

## 1. Introducción

lo que, en nuestra opinión, las adaptaciones cardiacas, al menos las relativas a la estabilidad eléctrica y la arritmogénesis producidas durante el entrenamiento no deberían estar mediadas por la apertura de los canales de potasio ATP-dependientes. Estudios recientes llevados a cabo en ratones transgénicos apoyarían incluso que las subunidades que conforman el canal de potasio no serían necesarias para la protección durante la agresión isquémica mostrando incluso reducciones en el tamaño del infarto frente a los animales control (Stoller *et al.*, 2007; Elrod *et al.*, 2008).

### **1.3. RESUMEN DE LA JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

Dado que ha sido publicado que la realización de ejercicio físico aeróbico de forma regular ejerce efectos protectores frente al desencadenamiento de arritmias por reentrada como la fibrilación ventricular, principal causa de muerte súbita de origen cardiaco en el mundo industrializado, y existiendo la controversia en torno a si esta cardioprotección del entrenamiento se encuentra mediada por un efecto facilitador, o por el contrario, bloqueante de  $I_{KATP}$  durante la isquemia miocárdica, hemos planteado la presente investigación en corazón aislado y perfundido de conejo, sometido a isquemia global normotérmica, en la que realizaremos una comparación de los efectos electrofisiológicos intrínsecos producidos por la realización de ejercicio físico crónico y los derivados de la distinta modulación de los canales  $KATP$ , tanto en situación de normal oxigenación como bajo condiciones de isquemia global, con el objetivo de establecer similitudes o divergencias entre el comportamiento electrofisiológico de los grupos tratados y el grupo entrenado que puedan contribuir a esclarecer la participación y el grado de modulación del mencionado canal en las modificaciones electrofisiológicas producidas por la adaptación al entrenamiento. Nuestra hipótesis de trabajo ha sido: el ejercicio físico crónico produce modificaciones en los parámetros electrofisiológicos ligados a la instauración y mantenimiento de arritmias por reentrada en un sentido beneficioso, tanto en situación de normoxia como tras isquemia global normotérmica, y la administración de un bloqueante del canal  $KATP$  ejerce un efecto electrofisiológico similar al que exhibe el ejercicio físico crónico.

#### **1.4. PLAN DE TRABAJO.**

Para la consecución de los objetivos propuestos planteamos el siguiente plan de trabajo:

1. Diseño y puesta a punto del modelo experimental necesario para reproducir las condiciones de isquemia global normotérmica y del protocolo electrofisiológico.

2. Estabulación de los animales y aplicación del protocolo de entrenamiento en tapiz rodante durante 6 semanas, a los conejos pertenecientes al grupo entrenado.

3. Estabulación, durante el periodo de tiempo de entrenamiento, de los animales pertenecientes a los grupos control, glibenclamida y pinacidil.

4. Tras el periodo de entrenamiento y/o estabulación, desarrollo del protocolo electrofisiológico en corazón aislado para la determinación de los parámetros objeto de estudio en los grupos control, entrenado, pinacidil (abridor canal KATP) y glibenclamida (bloqueante del mismo), bajo condiciones de normal oxigenación y tras isquemia global normotérmica.

5. Análisis de los resultados y aplicación de los tests de inferencia estadística correspondientes con el fin de extraer las conclusiones más apropiadas.

---

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 2.1 MATERIALES.

### 2.1.1 Animales de experimentación.

Para completar este trabajo de investigación utilizamos 45 conejos macho de raza Nueva Zelanda (*oryctolagus cuniculus*) facilitados por la Granja San Bernardo S.L. Los animales permanecieron siete semanas estabulados en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM) de la Universitat de València. Los conejos fueron alimentados *ad libitum* y alcanzaron un peso medio al final del periodo de estabulación de  $3,87 \pm 0,25$  Kg. Las condiciones de estabulación fueron: temperatura entre 21-23°C, humedad relativa del 31% y control en los ciclos de luz alternando la luz artificial con la oscuridad. Durante este periodo de tiempo, se sometió a los conejos asignados al grupo entrenado (n=12) a un protocolo de entrenamiento aeróbico en cinta rodante. Una vez finalizada la fase de entrenamiento y/o estabulación, se dio paso a la preparación experimental para el estudio electrofisiológico de cada uno de los corazones. En ese momento, los conejos tenían una edad de 16 semanas.

### 2.1.2 Reactivos.

- Solución de Tyrode, compuesta por  $\text{CaCl}_2$  (2.2 mM),  $\text{MgCl}_2$  (0.6 mM), KCl (4.7 mM),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1.2 mM),  $\text{NaHCO}_3$  (24.2 mM), NaCl (130 mM) y glucosa (12 mM), todos ellos de *Panreac Química*® S.A.
- Solución de heparina sódica al 5% (*Rovi*®) para la heparinización del animal y la prevención de episodios trombo-embólicos.

## 2. Material y métodos

- Tiopental sódico (*B Braun Medical*, Barcelona, España) para el sacrificio del animal.
- Dimetilsulfóxido, *Panreac Química*<sup>®</sup>, como vehículo para la disolución e infusión de los fármacos.
- Glibenclamida de *Sigma-Aldrich Química*<sup>®</sup>, para el bloqueo de los canales KATP.
- Pinacidil de *Sigma-Aldrich Química*<sup>®</sup>, para la apertura de los canales KATP.

### 2.1.3 Aparatos.

- Balanza para el pesado de los animales (*Soehnle*<sup>®</sup>).
- Balanza de precisión para para el pesado de los reactivos (*Precisa Gravimetrics AG*).
- Bomba de jeringa *IVAC*<sup>®</sup> P4000 para el ajuste de la concentración de fármaco infundido.



**Figura 2.1.** Bomba de infusión *IVAC*<sup>®</sup> P4000.



- Tapiz rodante LE8700 diseñado expresamente para el entrenamiento de conejos (Panlab® S.L.). La unidad de control permite regular la velocidad de la cinta y el tiempo de carrera.



**Figura 2.2.** Tapiz rodante y unidad de control.

### 2.1.4 Sistemas y programas informáticos.

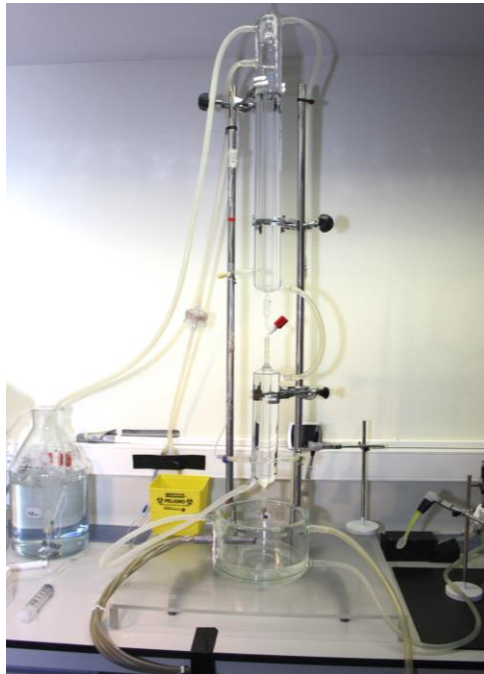
#### 2.1.4.1 Sistema de soporte metabólico tipo Langendorff.

- Sistema de perfusión para corazón aislado. Mediante una bomba peristáltica y un sistema de termostatación es posible perfundir el órgano con una solución nutritiva de Tyrode oxigenado atemperado, y así, preservar su integridad metabólica durante el protocolo electrofisiológico.
- Bomba peristáltica (Cole-Parmer Instrument co.) que impulsa la solución de Tyrode desde un recipiente reservorio externo, donde se carbogena (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>), hasta la parte superior de la columna

## 2. Material y métodos

del sistema Langendorff, previo paso por un filtro de partículas de 0,5 micras.

- Bomba circulante de termostatación (*Neslab Instruments, inc*) que mantiene un flujo de agua caliente a través de un circuito que envuelve al conducto por donde fluye la solución de Tyrode, para atemperarla a 37°C antes de su llegada al corazón aislado.

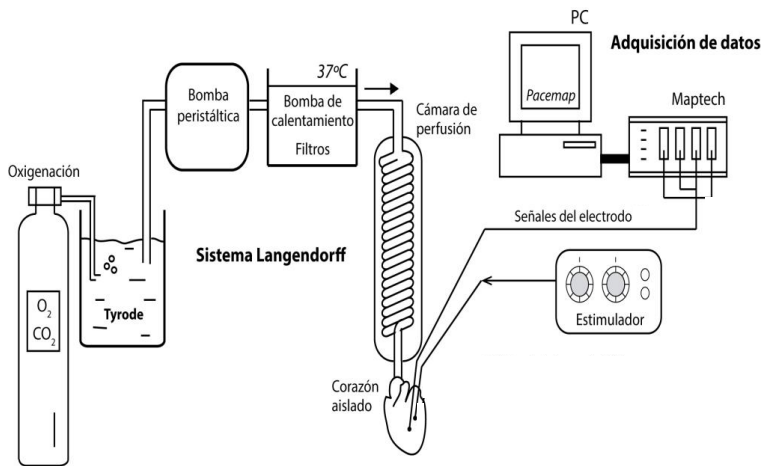


**Figura 2.3.** Detalle del sistema de soporte metabólico tipo Langendorff y vaso termostático.

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 a través de una cánula insertada en la aorta ascendente.

El Tyrode perfunde el tejido cardíaco a través de las arterias coronarias durante la fase diastólica, como ocurre durante el ciclo cardíaco normal. Con esta técnica, las cámaras izquierdas del corazón permanecen esencialmente vacías 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.

La utilización de modelos experimentales en los que se mantiene la perfusión coronaria durante la FV inducida (modelo utilizado tradicionalmente por nuestro grupo) permite mantener un estado metabólico adecuado durante el proceso fibrilatorio, excluyendo esta variable a la hora de analizar sus características.



**Figura 2.4.** Representación esquemática del sistema Langendorff.

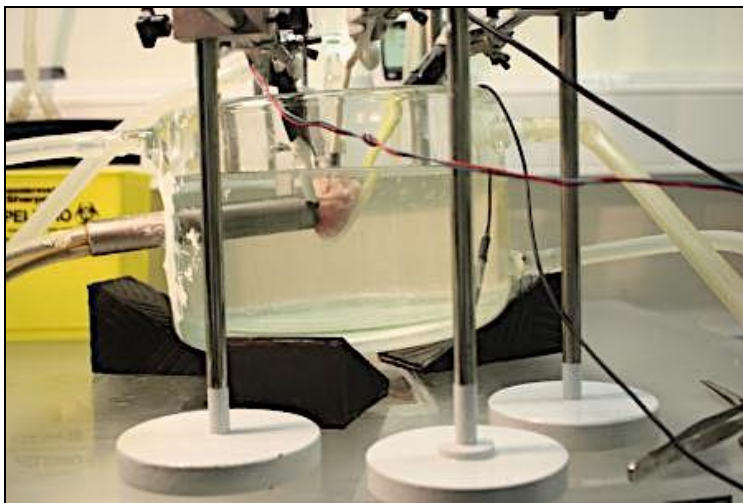
No ocurre así en el desarrollo fisiopatológico habitual asociado a la citada arritmia: el desencadenamiento de la FV *in vivo* implica la abolición de la perfusión coronaria, la aparición de isquemia y el

## 2. Material y métodos

deterioro metabólico del miocardio, que por sí mismos modifican las características del proceso fibrilatorio.

El desarrollo de esta tesis doctoral ha supuesto, por tanto, la puesta en marcha de un modelo, que posibilita el estudio de la FV de modo aproximado al modelo *in vivo*, y que pretende evaluar si el ejercicio físico de carácter regular puede atenuar el deterioro electrofisiológico asociado al proceso isquémico que implica daño tisular.

Para poner en marcha este nuevo modelo se ha tenido que diseñar y construir, *ex profeso*, un baño termostático de vidrio (figura 2.5) que nos permitiese reproducir las condiciones necesarias para generar una isquemia global sin que la temperatura en el miocardio disminuyese tras el cese de la perfusión coronaria (figura 2.5).



**Figura 2.5.** Detalle del vaso termostático artesanal, construido *ex profeso* para el desarrollo de la tesis doctoral y disposición de los electrodos de estimulación y registro.

Este baño, elaborado a partir de técnicas artesanales de vidrio, consta de una doble “camisa” a través de la cual se puede recircular agua atemperada a  $40,2\pm 0,3^{\circ}\text{C}$  (la misma que calienta la solución nutritiva de Tyrode con la que perfundimos el corazón) lo que nos permite disponer, tras las correspondientes pérdidas caloríficas con el entorno, de un medio a  $37,6\pm 0,4^{\circ}\text{C}$  donde queda sumergido el corazón.

Asimismo ha sido necesario diseñar y complementar (también de modo artesanal) el anterior baño, con dispositivos, para hacerlo manipulable y permitir su adaptación a nivel de corazón y electrodos de estimulación y registro.

### 2.1.4.2. Sistemas de estimulación.

- **Electrodo bipolar** de estimulación ventricular de acero inoxidable de 0.125 mm de diámetro y separación interelectrodo de 1 mm. Este electrodo se ubica en la pared libre del ventrículo izquierdo y se encuentra conectado al estimulador Grass<sup>®</sup>.
- **Estimulador Grass<sup>®</sup> S88** (Grass Instruments, Inc., Quincy, M.A., U.S.A.) provisto de unidad de aislamiento (SIU5). El sistema permite controlar parámetros como la frecuencia, la intensidad y la duración de los pulsos rectangulares de corriente que nos permiten llevar a cabo los tests electrofisiológicos en ritmo estimulado y la inducción de la fibrilación ventricular.

## 2. Material y métodos



**Figura 2.6.** Estimulador Grass® S88 y unidad de aislamiento SIU5.

- **Sistema computarizado** conectado al estimulador para estimulación programada.

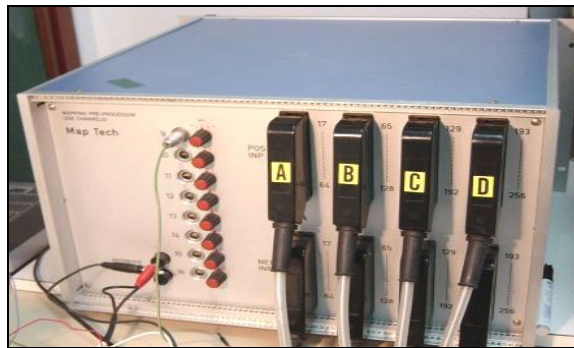
### 2.1.4.3. Sistemas de registro.

- **Electrodo bipolar** de plata de 0,5 mm de diámetro y separación interelectrodo de 1 mm para el registro del electrograma auricular.
- **Placa multielectrodo** compuesta por 256 electrodos unipolares de acero inoxidable de 0.125 mm de diámetro y distancia interelectrodo de 1 mm, utilizada para el registro de los electrogramas ventriculares.



**Figura 2.7.** Multielectrodo de registro ventricular.

- **Sistema de cartografía de la actividad eléctrica** (*MapTech*<sup>®</sup>, Waalre, Holanda) para la adquisición, digitalización y procesado de las señales epicárdicas ventriculares. El sistema consta de 256 canales para el registro de los electrogramas que se amplifican con una ganancia de 50-300 y se filtran con un ancho de banda de 1-400 Hz (frecuencia de muestreo 1 kHz, resolución 12 bits). Los registros se almacenan en soporte digital para su posterior análisis a través del *software* indicado.



**Figura 2.8.** Sistema de cartografía *MapTech*<sup>®</sup>.

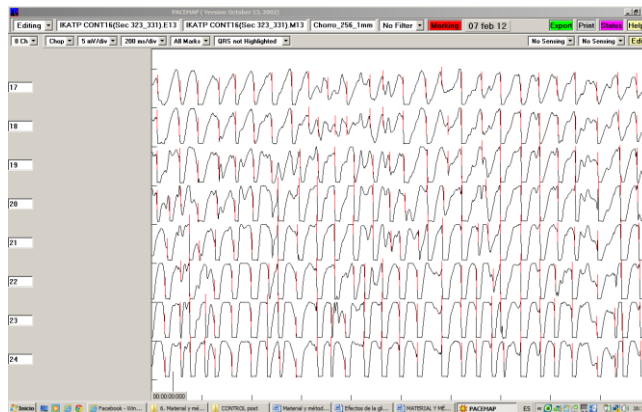
#### 2.1.4.4. Programas informáticos.

- **Pacemap**<sup>®</sup>, *software* asociado al sistema de adquisición *MapTech*<sup>®</sup> utilizado para la captura de los electrogramas ventriculares y su posterior análisis. Permite la visualización canal a canal 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 obtenidos.

Realiza las funciones de configuración de la adquisición, permitiendo el cambio de la ganancia, frecuencia de muestreo, control

## 2. Material y métodos

del registro, edición del registro, selección de tramos de las señales, etc. Posibilita, por tanto, el almacenamiento de los registros electrográficos obtenidos durante el protocolo electrofisiológico en el ordenador y su extracción rápida y sencilla para la realización de diversas operaciones relacionadas con la cartografía de la actividad eléctrica cardiaca o el marcado de los instantes de activación. Para todo ello es necesaria la utilización de las matrices de correspondencia electrodo-canal que codificarán la distribución espacial de las señales.



**Figura 2.9.** Detalle del programa *Pacemap*®.

- **Matlab**® (R2009a), programa que ofrece un entorno de desarrollo integrado con un lenguaje de programación propio, sobre el que se han 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<sup>®</sup>.

- **SPSS<sup>®</sup> 22**, utilizado para la gestión y el análisis estadístico de los resultados obtenidos de los diferentes parámetros analizados.
- **Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 2010**, para la gestión y tratamiento de los resultados obtenidos de los diferentes parámetros analizados.
- **Microsoft<sup>®</sup> Word<sup>®</sup> 2010**, como soporte informático para la elaboración del presente trabajo.

## 2.2 MÉTODOS.

### 2.2.1 Grupos de estudio.

Los animales fueron distribuidos en 4 grupos experimentales: control, n=13; entrenado, n=12; pinacidil (abridor de los canales KATP), n=9; y glibenclamida (bloqueante de los mismos), n=11. El grupo entrenado fue sometido a un protocolo de entrenamiento aeróbico en cinta rodante durante seis semanas.

### 2.2.2 Protocolo de entrenamiento.

El entrenamiento de los animales consistió en la aplicación de un protocolo de carrera continua en cinta rodante durante 6 semanas, a razón de 5 sesiones por semana. Cada sesión se compuso de 6 series de carrera de 4 minutos de duración, con 1 minuto de descanso entre series a una velocidad de 0,33 m/s (20 m/min). Esto supuso un entrenamiento

## 2. Material y métodos

diario de 29 minutos de lunes a viernes con un periodo de descanso de dos días durante el fin de semana. Los conejos de los grupos control, glibenclamida y pinacidil, permanecieron estabulados en sus respectivas jaulas durante el periodo de tiempo que duró el entrenamiento, esto es, seis semanas más la semana que entraña la familiarización de los conejos con el *treadmill* adaptado.

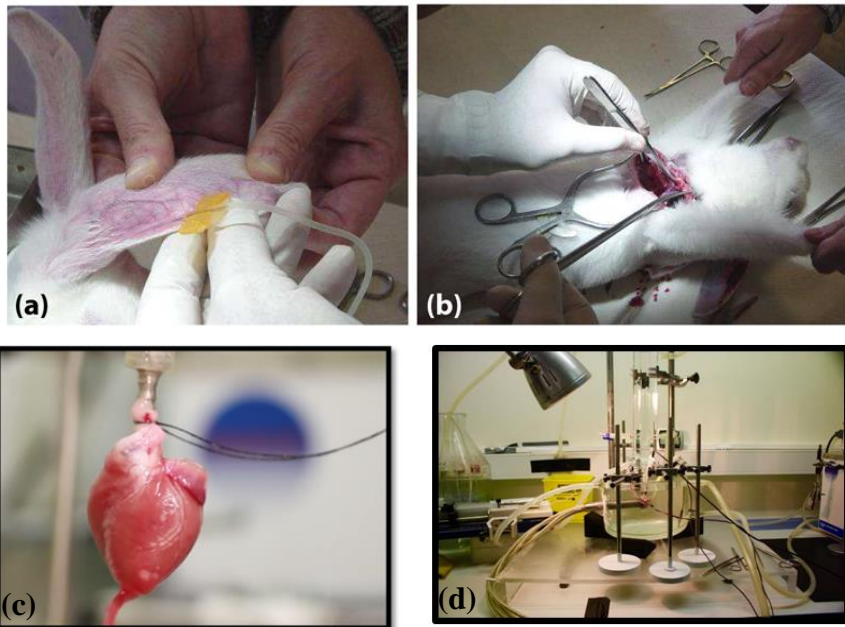


**Figura 2.10.** Animal entrenando en cinta rodante.

### 2.2.3 Protocolo experimental.

Tras el período de estabulación y/o entrenamiento, se dio paso a la fase experimental para el aislamiento de los corazones en el sistema de soporte metabólico (figura 2.11) y la ejecución del correspondiente protocolo electrofisiológico. Los animales fueron sacrificados mediante inyección intravenosa de tiopental sódico (60 mg/kg) y heparina (0.2 ml/kg) y se extrajo el corazón a través de toracotomía medioesternal y pericardiotomía, para inmediatamente introducirlo en Tyrode a baja temperatura (1-5°C) y llevar a cabo la disección de los grandes vasos

para su incorporación al sistema de perfusión a través de la aorta ascendente. Una vez conectado al sistema Langendorff, mediante hilo de seda, para su perfusión a presión constante de 60 mmHg, y estabilizada la preparación, se procedió a la inmersión del corazón en el baño termostático y a la disposición de los electrodos de estimulación y registro. 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.** 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), fijación del corazón al sistema (c) e inmersión en vaso termostático (d).

El registro de la actividad ventricular se realizó por medio de un electrodo múltiple de registro con 256 electrodos unipolares de acero inoxidable dispuesto el ventrículo izquierdo. El registro de los

## 2. Material y métodos

electrogramas fue obtenido con un sistema de cartografía de la actividad eléctrica cardíaca (MapTech®) como se ha comentado anteriormente.

### **2.2.4 Protocolo electrofisiológico.**

Tras ubicar el corazón en el sistema Langendorff y situar los electrodos de estimulación y registro se procedió a la realización del siguiente protocolo electrofisiológico:

- 1. Estabilización de la preparación (20').**
- 2. Estimación del flujo coronario:**  
Cálculo de la velocidad de infusión de los fármacos.
- 3. Registro electrográfico basal pre-inmersión (10''):**  
Determinación de la longitud del ciclo sinusal (LCS).
- 4. INMERSION** del corazón en baño termostático.
- 5. Registro electrográfico basal post-inmersión (10''):**
- 6. Determinación del umbral de excitación ventricular.**
- 7. Estimulación a frecuencia fija: 10% > LCS (10'').**
- 8. Estimulación a frecuencia fija 4 Hz. (10'').**
- 9. Estimulación a frecuencia fija 5 Hz. (10'').**
- 10. Test del extra estímulo ventricular (TEEV) (10% > LCS) .**
- 11. TEEV, 250 ms desde 200 ms.**
- 12. TEEV, 200 ms desde 200 ms.**
- 13. INFUSIÓN DMSO o DMSO + FÁRMACO (15').**
- 14. Registro electrográfico basal post-infusión (10'').**
- 15. REPETICIÓN pasos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.**
- 16. Determinación del umbral de excitación ventricular.**

**17. INDUCCIÓN FV:**

Estimulación a frecuencias crecientes.

**18. REGISTRO FV pre-oclusión (5').**

**19. OCLUSIÓN CORONARIA COMPLETA.**

**20. REGISTRO FV oclusión (5').**

**21. REGISTRO FV oclusión minutos 6, 7, 8, 9 y 10.**

El protocolo, diseñado para esta investigación, consta de una primera fase en la que estudiamos parámetros electrofisiológicos en condiciones de normal oxigenación, tanto en ritmo sinusal como en ritmo estimulado, así como durante la FV inducida, con el objetivo de evaluar las propiedades cardíacas relacionadas con el automatismo, la conducción auriculoventricular, la refractariedad y la heterogeneidad electrofisiológicas intrínsecas, la inducibilidad de la FV y las características del patrón fibrilatorio, antes y después de la infusión de los fármacos (glibenclamida y pinacidil 10 $\mu$ M), para de ese modo, detectar posibles efectos del entrenamiento o cualquier modificación de las propiedades electrofisiológicas derivada de la distinta modulación de los canales KATP.

En una segunda fase procedemos al cese completo de la perfusión coronaria durante la FV y procedemos al análisis de la evolución de los trazados fibrilatorios bajo condiciones de isquemia global. A continuación describiremos los parámetros analizados en las respectivas fases:

## 2. Material y métodos

### 2.2.5 Parámetros electrofisiológicos objeto de estudio: Definición y determinación.

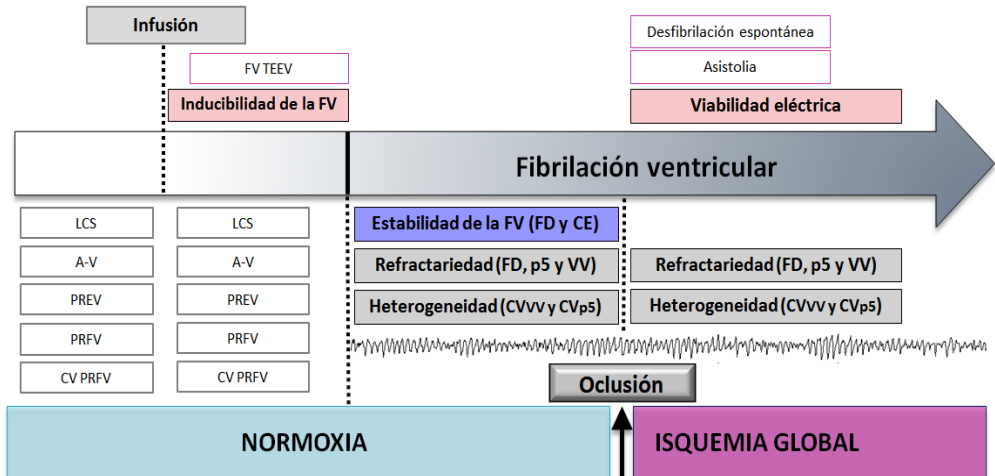
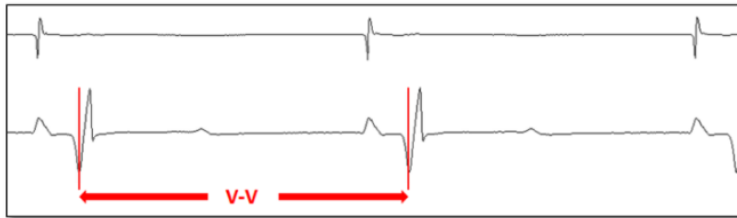


Figura 2.12. Detalle del protocolo electrofisiológico y parámetros objeto de estudio.

#### 2.2.5.1 Para valorar el cronotropismo.

**2.2.5.1.1 Longitud de ciclo sinusal (LCS).** Tiempo, expresado en milisegundos, que existe entre una despolarización auricular o ventricular espontánea y su consecutiva. Representa la frecuencia de disparo de las células marcapasos del nodo sinoauricular y por tanto una estimación directa de la frecuencia cardiaca intrínseca de cada corazón. Se analizó determinando el intervalo V-V, es decir, el tiempo transcurrido entre dos despolarizaciones ventriculares espontáneas consecutivas, antes y después de la inmersión en el baño termostático, para descartar posibles efectos del nuevo modelo sobre el automatismo, y tras la infusión de los fármacos para investigar la posible influencia de los canales K<sub>ATP</sub> sobre el mencionado parámetro.



**Figura 2.13.** Determinación del intervalo V-V.

### 2.2.5.2 Para valorar la conducción auriculoventricular.

**2.2.5.2.1 Longitud del intervalo A-V.** Tiempo, expresado en milisegundos, existente entre el inicio de la despolarización auricular y la correspondiente despolarización ventricular. Representa un tiempo de conducción del impulso desde las aurículas hasta los ventrículos y, por tanto, su estimación permite la valoración del sistema de conducción auriculoventricular. Se analizó midiendo el tiempo transcurrido desde el inicio de la despolarización auricular hasta la correspondiente despolarización ventricular, antes y después de la inmersión en el baño termostático, para descartar posibles efectos del nuevo modelo sobre la conducción auriculoventricular, y tras la infusión de los fármacos para estudiar la posible participación de los canales en el citado parámetro.



**Figura 2.14.** Determinación del intervalo A-V.

## 2. Material y métodos

### 2.2.5.3 Para valorar la refractariedad miocárdica.

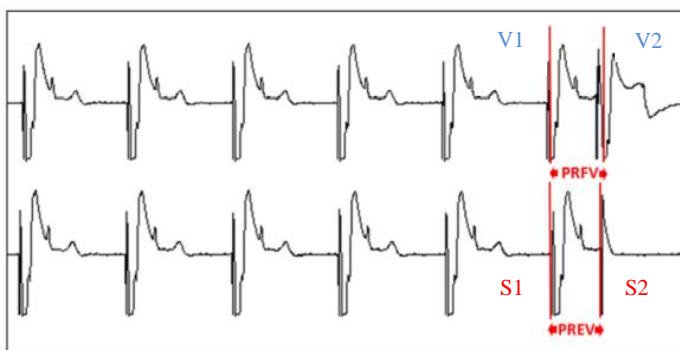
Se determinaron los periodos refractarios efectivos (PREV) y funcionales (PRFV) utilizando el test del extraestímulo ventricular (TEEV). Esta técnica consiste en la aplicación continuada de trenes de estimulación ventricular a los que se acopla un extraestímulo (S2) que se va acercando al último estímulo del tren fijo, a razón de 5 ms por tren, hasta que se alcanza el periodo refractario del tejido estimulado.

#### 2.2.5.3.1 Periodo refractario efectivo ventricular (PREV).

Máximo intervalo de acoplamiento del extraestímulo ventricular (S1-S2) sin captura ventricular (S2 sin V2).

#### 2.2.5.3.2 Periodo refractario funcional ventricular (PRFV).

Mínimo intervalo entre la respuesta ventricular producida por el último estímulo del tren base (S1) y la desencadenada con el extraestímulo (S2) (mínimo intervalo V1-V2).

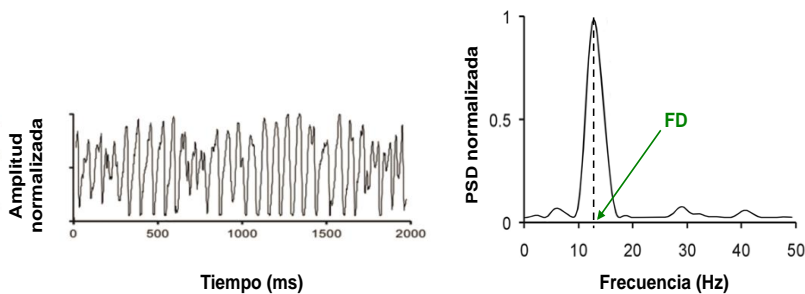


**Figura 2.15.** Determinación de la refractariedad ventricular a través del TEEV. PRFV=periodo refractario funcional ventricular; PREV=periodo refractario efectivo ventricular (Modificado de Zarzoso, 2011).



Una vez completadas las pruebas para valorar la refractariedad miocárdica en ritmo estimulado se procedió a inducir la fibrilación ventricular mediante estimulación a frecuencias crecientes, a todos aquellos corazones que no hubieron fibrilado durante la aplicación del TEEV, con el objetivo de llevar a cabo un análisis espectral y en el dominio del tiempo, de los trazados fibrilatorios.

**2.2.5.3.3 Frecuencia dominante (FD) de la FV.** La transformada rápida de Fourier permite descomponer la compleja señal fibrilatoria en sus distintos armónicos e identificar la senoide que coincide con el de mayor amplitud y que representa la FD de la FV (figura 2.16).



**Figura 2.16.** Trazado fibrilatorio registrado por uno de los 240 electrodos ventriculares (izquierda) y su correspondiente espectro de potencia (derecha). La FD coincide con el pico máximo de densidad espectral de potencia. Abreviaturas: PSD=densidad espectral de potencia; FD=frecuencia dominante; Hz= hercios.

La FD media de la fibrilación ventricular aporta información directamente relacionada con los ciclos de activación epicárdica durante la arritmia. 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. Se obtuvo el espectro a partir del periodograma modificado

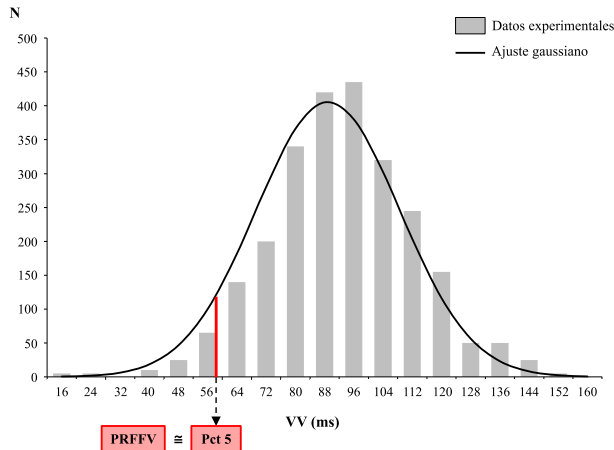
## 2. Material y métodos

de Welch, utilizando ventana de Hanning y 2 tramos no solapados (resolución: 0,5Hz). Se analizó la FD media de las señales fibrilatorias registradas por la placa multielectrodo durante 300 s de FV (240 canales válidos) en el ventrículo izquierdo, utilizándose para el análisis el valor promedio de los 240 canales en cada uno de los segmentos de 4 segundos procesados durante los cinco minutos de estabilización bajo perfusión normalmente oxigenada.

Se mantuvo la arritmia durante 5 minutos sin interrumpir la perfusión coronaria y se realizó un registro continuo de la actividad durante este periodo. A partir de dichos registros obtuvimos la FD media en cada canal y se llevó a cabo un análisis de su evolución durante cada uno de los minutos de estabilización de la arritmia previos a la oclusión de la perfusión como índice de refractariedad y estabilidad electrofisiológica. El estudio de la señal fibrilatoria sin interrumpir la perfusión elimina el factor de deterioro electrofisiológico asociado a la isquemia y permite la extracción de información indirecta sobre las propiedades electrofisiológicas del tejido analizado (Chorro *et al.*, 2000).

**2.2.5.3.4. Periodo refractario funcional durante la FV (PRFFV).** Se considera este parámetro como una aproximación del periodo refractario funcional durante la FV (PRFFV). Utilizamos el percentil 5 (Pct5) de la distribución normal de todos los intervalos VV. El Pct5 representa el intervalo más corto que separa dos respuestas normalmente propagadas durante la arritmia y por tanto, un parámetro representativo de la refractariedad del tejido miocárdico (Duytschaever *et al.*, 2001). El Pct5 representa, en una distribución normal de los

intervalos VV, el valor (en ms) por debajo del cual quedan englobados el 5% de todos los intervalos VV (figura 2.17).



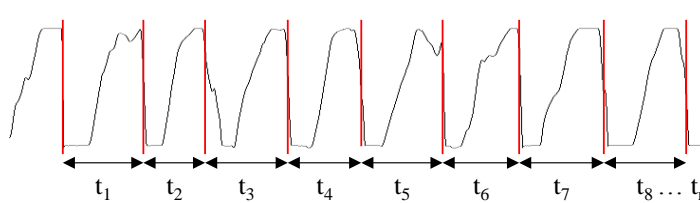
**Figura 2.17.** Histograma que muestra la distribución de los intervalos V-V y la estimación del PRFFV a través de la determinación del Pct5 de los mismos (tomado de Del Canto, 2014).

A partir de los registros electrográficos se obtuvo la activación local en cada uno de los 256 electrodos que forman el multielectrodo identificando el momento 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, antes de la oclusión coronaria y cada minuto durante los 10 minutos de isquemia global normotérmica en los cuatro grupos experimentales.

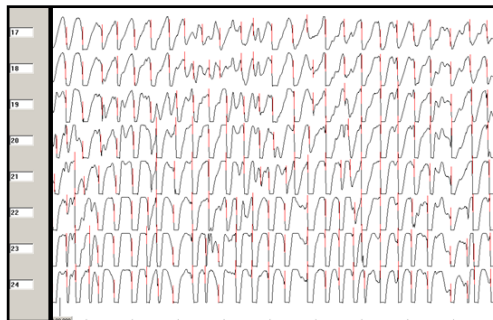
**2.2.5.3.4 Intervalos diastólicos del ciclo fibrilatorio (intervalos V-V).** Definidos como el tiempo transcurrido entre dos activaciones locales consecutivas en el ventrículo, intervalo de activación ventricular o intervalo fibrilatorio. El marcaje de los electrogramas ventriculares

## 2. Material y métodos

obtenidos durante el protocolo experimental se realizó con el programa Pacemap® mediante un proceso semiautomático de identificación de los momentos de pendiente máxima negativa ( $dv/dt$ ), correspondientes a los momentos de activación de la FV.



**Figura 2.18.** Segmento de electrograma en FV donde se muestran las marcas de los instantes de activación e intervalos VV ( $t_i$ ).



**Figura 2.19.** Programa Pacemap®, utilizado para la adquisición y registro de las señales eléctricas y posterior análisis. En rojo las marcas sobre los momentos con pendiente máxima negativa ( $dv/dt$ ), o lo que es lo mismo, los momentos de activación de la señal fibrilatoria ventricular.

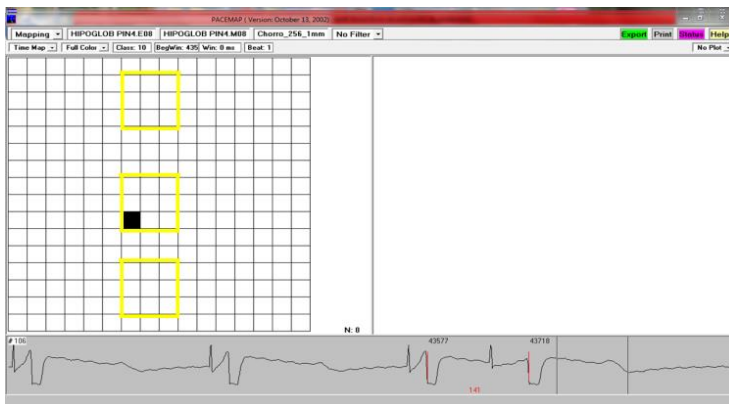
### 2.2.5.4 Para valorar la heterogeneidad electrofisiológica.

#### 2.2.5.4.1 Coeficiente de variación de los PRFV (CVPRFV).

Así como los PREV son únicos y corresponden al punto exacto del tejido donde se ha llevado a cabo la estimulación eléctrica programada,

los PRFV pueden mostrar cierta variabilidad en función de la arquitectura tisular, las conexiones intercelulares o la densidad de canales iónicos propia del territorio ventricular circundante a la zona de estimulación.

Desarrollamos este novedoso parámetro para el estudio de la heterogeneidad de los PRFV seleccionando tres zonas delimitadas del ventrículo izquierdo (izquierda, central y derecha) y determinando en nueve electrodos de cada una de las áreas los PRFV, antes y después de la infusión de los fármacos correspondientes.



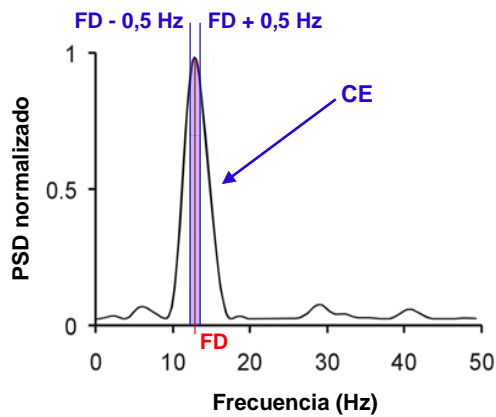
**Figura 2.20.** Detalle de las zonas de elección de electrogramas (27 canales) para el estudio de la heterogeneidad de los PRFV.

A continuación, se calculó el coeficiente de variación del periodo refractario funcional mediante la siguiente expresión:

$$CV_{PRFV} = \frac{DE_{PRFV}}{PRFV}$$

## 2. Material y métodos

**2.2.5.4.2 Concentración espectral (CE) de la FV.** Al igual que se hizo con la evolución de la FD media durante el periodo de estabilización de la arritmia sin interrumpir la perfusión, se llevó a cabo el análisis en el dominio de la frecuencia de este parámetro que se define como el cociente del área del espectro de potencia contenida en el intervalo  $FD \pm 0,5 \text{ Hz}$ , dividido por el área total del espectro de potencia de la señal (figura 2.21).



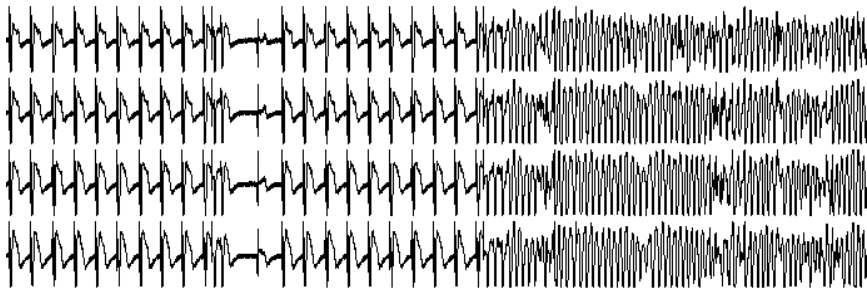
**Figura 2.21.** Espectro de potencia correspondiente a una señal de FV. La concentración espectral es el porcentaje del total del espectro de potencia contenida en el intervalo  $FD \pm 0,5 \text{ Hz}$ . Abreviaturas: PSD=densidad espectral de potencia; FD=frecuencia dominante; Hz=hercios; CE=concentración espectral (%).

Se trata por tanto de un parámetro relacionado con la heterogeneidad que utilizamos frecuentemente en nuestros estudios electrofisiológicos que aporta información acerca de la regularidad de la señal fibrilatoria. Cuanto mayor sea la CE más concentrada alrededor de la FD, valga la redundancia, será la distribución de frecuencias de los distintos armónicos que componen la señal fibrilatoria, es decir, más regular y homogénea será la activación eléctrica epicárdica durante la arritmia y mayor la estabilidad eléctrica.

**2.2.5.4.3 Coeficiente de variación de los intervalos diastólicos del ciclo fibrilatorio (CVVV).** Índice de dispersión de los intervalos VV como estimador de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio ventricular. Calculado como el cociente de la desviación típica de los intervalos VV sobre la media de los mismos multiplicado por 100. Nos permite obtener una medida de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio ventricular.

**2.2.5.5 Para la valoración de la arritmogénesis.**

**2.2.5.5.1 Inducibilidad de la fibrilación ventricular (IFV).** Definida como la mayor o menor propensión al desencadenamiento de la fibrilación ventricular durante la aplicación del test del extraestímulo ventricular (TEEV). Cuando existen ciertas condiciones favorables para el desencadenamiento de arritmias por reentrada (sustrato arritmogénico), como periodos refractarios reducidos y heterogeneidad en la repolarización, la simple aplicación del TEEV puede provocar la entrada en fibrilación de los corazones sometidos a estudio electrofisiológico.



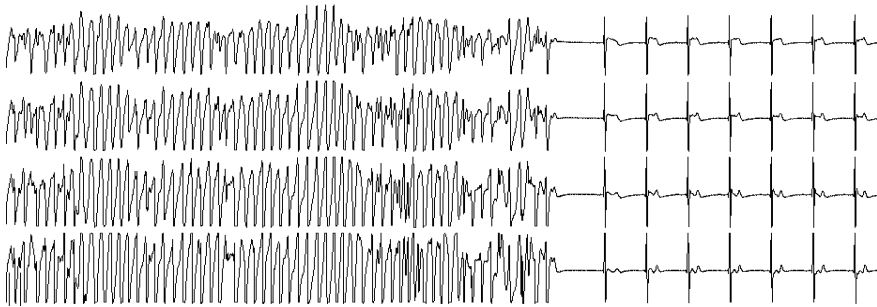
**Figura 2.22.** Detalle de cuatro electrogramas en los que se aprecia la entrada en fibrilación ventricular de un corazón sometido al TEEV.

## 2. Material y métodos

Para determinar la IFV se estudió la incidencia de FV durante la realización el test del extrastimulo ventricular (TEEV) y se evaluó la probabilidad de asociación entre dicho evento y los cuatro grupos experimentales utilizando una tabla de contingencia Gi-cuadrado.

### **2.2.5.5.2 Incidencia de desfibrilación espontánea (DFV).**

Transcurridos cinco minutos desde el desencadenamiento de la FV, se procedió a la oclusión y cese completo de la perfusión coronaria y al estudio la incidencia de desfibrilación espontanea durante los diez minutos de isquemia global normotérmica.



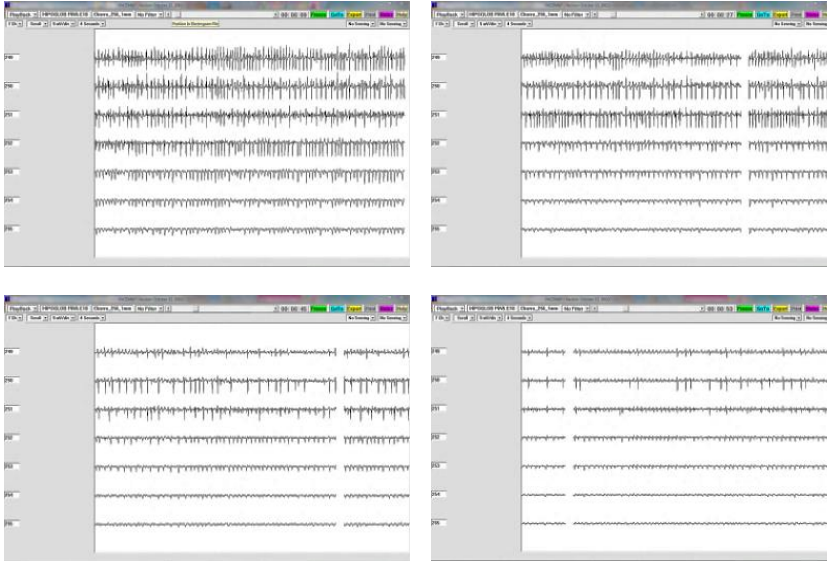
**Figura 2.23.** Detalle de cuatro electrogramas en los que se aprecia la desfibrilación espontánea de uno de los corazones.

### **2.2.5.6 Para la valoración de la viabilidad eléctrica.**

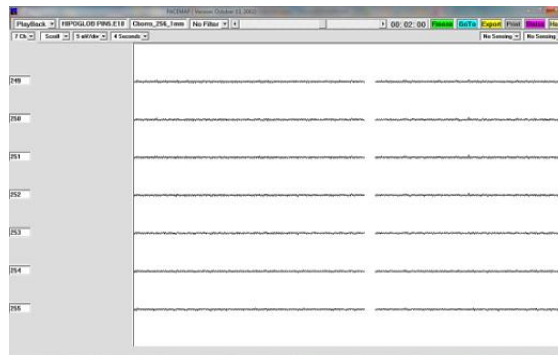
**2.2.5.6.1 Incidencia asistolia eléctrica.** Transcurridos cinco minutos desde el desencadenamiento de la FV, se procedió a la oclusión y cese completo de la perfusión coronaria y se evaluó la viabilidad del tejido determinando la incidencia de asistolia (ausencia total de



actividad eléctrica en los registros electrográficos) durante diez minutos de isquemia global normotérmica.



**Figura 2.24.** Evolución de los trazados fibrilatorios hacia la asistolia. Nótese el decremento progresivo en amplitud y frecuencia de la señal fibrilatoria.



**Figura 2.25.** Ausencia total de actividad eléctrica en los registros electrográficos de uno de los casos del grupo pinacidil que entró en asistolia durante la isquemia.

## 2. Material y métodos

### **2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

La normalidad de la distribución de los datos se verificó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de varianzas se contrastó mediante la prueba de Levene.

Para el estudio del efecto del entrenamiento y de la distinta modulación de los canales KATP sobre automatismo, conducción, refractariedad y heterogeneidad electrofisiológica miocárdica, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con corrección *post-hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples.

El análisis de las diferencias entre variables cualitativas se realizó mediante el test chi-cuadrado para tablas de contingencia con tres grados de libertad. Las diferencias se consideraron significativas para  $p < 0,05$ .

### **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.

---

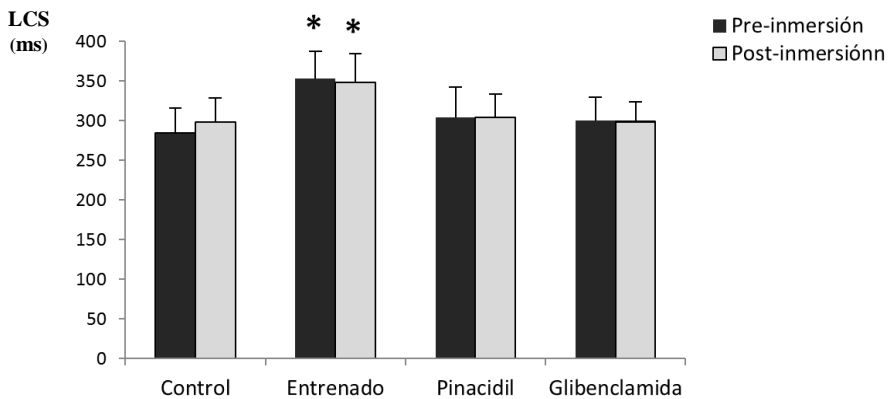
## **3. RESULTADOS**



### 3.1 CRONOTROPISMO.

#### 3.1.1 Longitud del ciclo sinusal (LCS).

Como se puede apreciar en la figura 3.1 no encontramos ningún efecto asociado a las nuevas condiciones de ubicación de los corazones, tras la inmersión de los mismos en el baño termostataado, sobre la frecuencia cardíaca intrínseca en ninguno de los grupos experimentales: control ( $284\pm 32$  vs  $299\pm 18$  ms, ns), entrenado ( $353\pm 36$  vs  $349\pm 36$  ms, ns), pinacildil ( $304\pm 39$  vs  $304\pm 29$  ms, ns) ni glibenclamida ( $300\pm 30$  vs  $299\pm 25$  ms, ns).



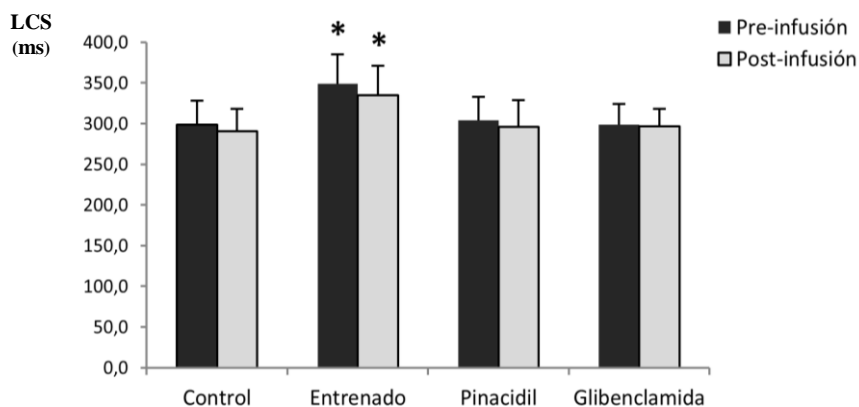
**Figura 3.1.** Efecto de la inmersión sobre la longitud del ciclo sinusal básico (LCS). Grupo control, n=10; grupo entrenado, n=11; grupo pinacildil, n=9 y grupo glibenclamida, n=10; ms=miliseundos. Las barras de error corresponden al error estándar. \*  $p < 0,05$  respecto a control.

La comparación entre grupos, por su parte, sí evidenció una LCS básico mayor, y por tanto una frecuencia cardíaca intrínseca menor, en el grupo de animales previamente entrenados: frente a control ( $353\pm 36$  vs  $284\pm 32$  ms,  $p < 0,05$ ), pinacildil ( $353\pm 36$  vs  $304\pm 39$  ms,  $p < 0,05$ ) y

### 3. Resultados

glibenclamida ( $353\pm 36$  vs  $300\pm 30$  ms,  $p<0,05$ ), que se mantuvo tras la inmersión en el baño termostático.

Al determinar la longitud del intervalo V-V tras la infusión de los fármacos tampoco se encontraron efectos relacionados con la distinta modulación de los canales de potasio ATP-dependientes. Como puede observarse en la figura 3.2, la longitud del ciclo sinusal permaneció inalterada tanto tras la apertura, como tras el bloqueo de los canales KATP en condición de normoxia.



**Figura 3.2.** Efecto de la infusión de fármacos sobre la longitud del ciclo sinusal básico (LCS). Grupo control,  $n=10$ ; grupo entrenado,  $n=11$ ; grupo pinacidil,  $n=8$  y grupo glibenclamida,  $n=10$ ; ms=milisegundos. Las barras de error corresponden al error estándar. \*  $p<0,05$  respecto a control.

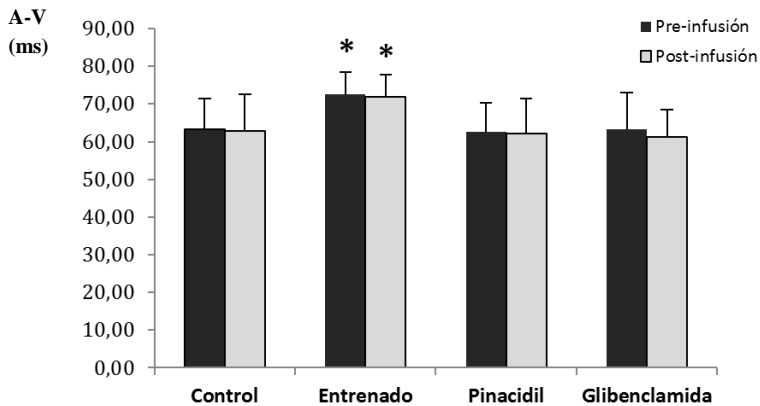
## 3.2 CONDUCCIÓN.

### 3.2.1 Longitud del intervalo auriculoventricular (A-V).

Las mediciones realizadas en los cuatro grupos experimentales para la valoración de la conducción auriculoventricular muestran que el

intervalo A-V, también fue mayor en el grupo entrenado que en el resto de grupos experimentales: control, pinacidil y glibenclamida ( $73\pm 6$  vs  $63\pm 8$  vs  $62\pm 8$  vs  $63\pm 14$ ms,  $p<0,05$ ), respectivamente.

La administración de fármacos tampoco afectó a la duración del intervalo A-V en condición de normal oxigenación (figura 3.3).



**Figura 3.3.** Efecto del entrenamiento físico y la distinta modulación de los canales KATP sobre la longitud del intervalo auriculoventricular (intervalo A-V). Grupo control, n=9; grupo entrenado, n=10; grupo pinacidil, n=8; y grupo glibenclamida, n=10; ms=milisegundos. Las barras de error corresponden al error estándar.\*  $p<0,05$  respecto a control.

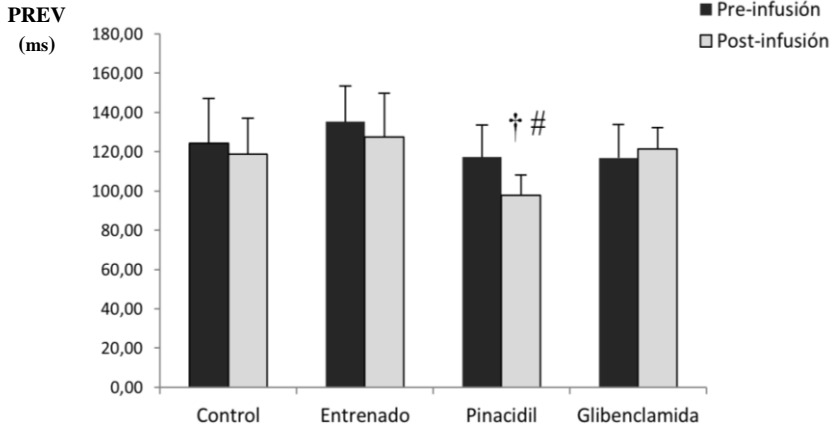
### 3.3 REFRACTARIEDAD MIOCÁRDICA.

#### 3.3.1 Periodo refractario efectivo ventricular (PREV).

En la figura 3.4 se recogen los resultados correspondientes a la media de los PREV obtenidos utilizando el test del extraestímulo ventricular (TEEV), con una longitud de ciclo de estimulación un 10%

### 3. Resultados

menor a la LCS básico, previa y posteriormente a la infusión de pinacidil y glibenclamida.



**Figura 3.4.** Periodo refractario efectivo ventricular antes y después de la infusión. Grupo control, n=11; grupo entrenado, n=11; grupo glibenclamida, n=10 y grupo pinacidil n=5; ms=milisegundos. Las barras de error corresponden al error estándar. #p<0,05 respecto al valor previo a la infusión. †p<0,05 respecto a entrenado.

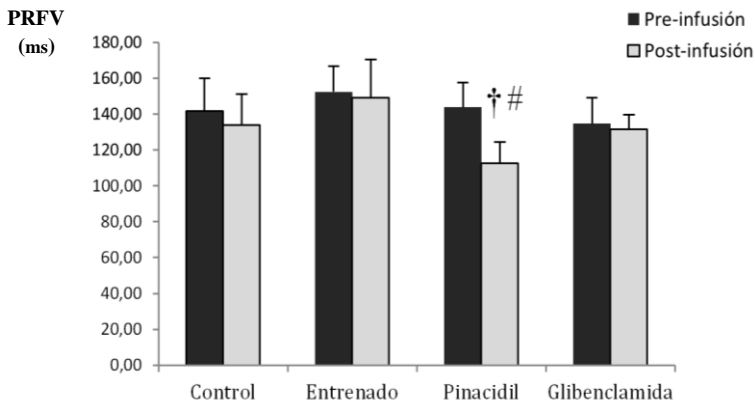
Cuando analizamos el efecto de la infusión no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los grupos control ( $124 \pm 23$  vs  $119 \pm 18$  ms, ns), entrenado ( $135 \pm 18$  vs  $128 \pm 22$  ms, ns) ni glibenclamida ( $117 \pm 16$  vs  $121 \pm 10$  ms, ns). Sin embargo, la infusión de pinacidil sí disminuyó el PREV, manifestando una alteración de la refractariedad miocárdica derivada de la apertura de los canales de potasio ATP-dependientes ( $117 \pm 17$  vs  $98 \pm 11$  ms,  $p < 0,05$ ).

Previamente a la infusión no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales. Sin embargo, tras la infusión, el PREV en el grupo tratado con pinacidil se redujo significativamente en relación al del grupo entrenado ( $p < 0,05$ ).



### 3.3.2 Periodo refractario funcional ventricular (PRFV).

El PRFV obtenido también en situación de normoxia y durante la aplicación de los mismos tests en ritmo estimulado, antes y después de la infusión, se muestra en la figura 3.5. De manera similar a lo observado en el análisis de los PREV, la infusión de fármacos tampoco produjo diferencias estadísticamente significativas en los grupos control ( $142\pm 18$  vs  $134\pm 17$  ms, ns), entrenado ( $152\pm 14$  vs  $149\pm 21$  ms, ns) ni glibenclamida ( $135\pm 16$  vs  $132\pm 12$  ms, ns), mientras que la administración de pinacidil sí tuvo como efecto una reducción de la refractariedad miocárdica ( $144\pm 14$  vs  $113\pm 8$  ms,  $p<0,05$ ).



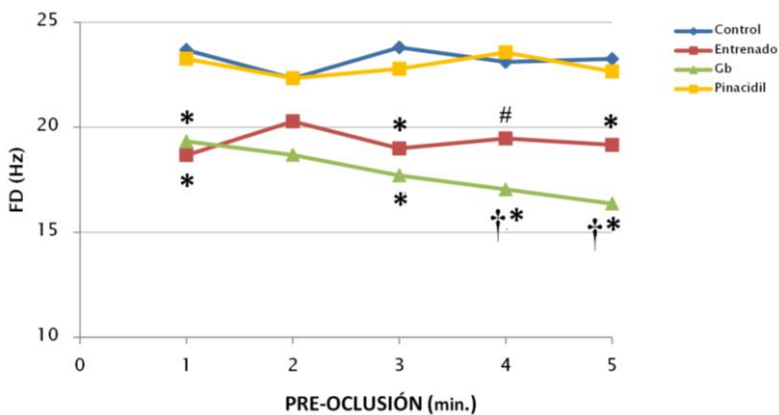
**Figura 3.5.** Periodo refractario funcional ventricular antes y después de la infusión de fármacos. Grupo control, n=11; grupo entrenado, n=11; grupo glibenclamida, n=10 y grupo pinacidil n=5; ms=milisegundos. Las barras de error corresponden al error estándar. # $p<0,05$  respecto al valor previo a la infusión. † $p<0,05$  respecto a entrenado.

Al realizar la comparación entre grupos, previamente a la infusión, tampoco se encontraron diferencias. Sin embargo, tras la misma, el PRFV disminuyó, de nuevo, en el grupo tratado con pinacidil al compararlo con el grupo entrenado ( $p<0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.3.3 Frecuencia dominante (FD) de la FV como parámetro relacionado con la refractariedad miocárdica.

En la figura 3.6 se representa la evolución de la FD media de la FV en los cuatro grupos experimentales durante los diferentes intervalos de tiempo analizados durante el periodo de estabilización de la arritmia previos a la oclusión arterial coronaria. Se puede observar como los valores máximos de FD durante la FV se dan en los grupos control y pinacidil cuyas frecuencias iniciales de entrada en la arritmia ( $24\pm 3$  y  $23\pm 5$  Hz, respectivamente) son significativamente mayores que las de los grupos entrenado y glibenclamida ( $19\pm 5$  y  $19\pm 3$  Hz,  $p<0,05$ ).



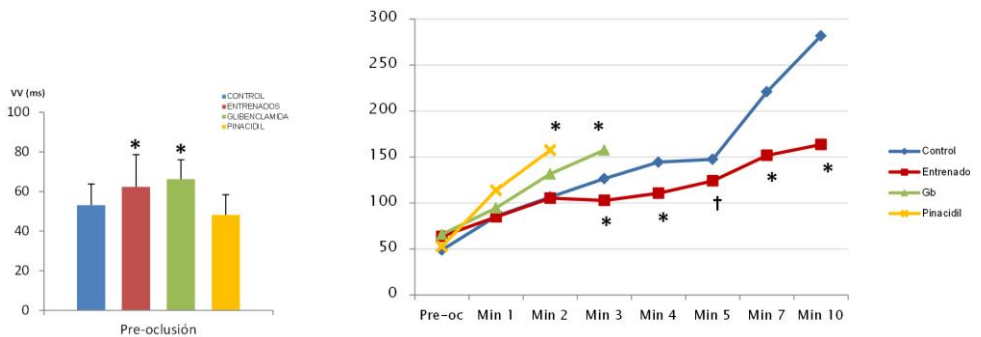
**Figura 3.6.** Evolución de la FD media de la FV. \* $p<0.05$  respecto a control. # $p=0.065$  respecto a control † $p<0.05$  respecto al valor previo a la oclusión.

La FD media se encuentra relacionada de manera inversa con los periodos refractarios (Chorro *et al.*, 2000; Ropella, 2001) por lo que estos resultados sugieren una modificación del patrón fibrilatorio ventricular tras el entrenamiento y el bloqueo de los canales KATP en situación de

normoxia, evidenciado por un descenso significativo de la frecuencia dominante media, que sería signo de una menor excitabilidad y una mayor estabilidad eléctrica en ambos grupos experimentales. Se observa también al analizar la evolución de la FD durante los 5 minutos de estabilización de la arritmia que las frecuencias de activación permanecen relativamente constante en todos los grupos salvo en el grupo tratado con glibeclamida donde comienzan a disminuir significativamente a partir del tercer minuto.

### 3.3.4 Intervalos diastólicos del ciclo fibrilatorio como parámetro relacionado con la refractariedad.

En la figura 3.8 mostramos los resultados relacionados con la media de las longitudes de los ciclos fibrilatorios determinadas durante la FV (intervalos VV), previa y posteriormente a la oclusión coronaria.



**Figura 3.8.** Intervalos VV, en los grupos control, entrenado, glibenclámida y pinacídil, en el instante previo al cese completo de la perfusión coronaria y evolución de la media de los mismos durante el periodo de isquemia global normotérmica. ms=milisegundos. Grupo control n = 10, grupo entrenado n =11, grupo glibenclámida n= 9 y grupo pinacídil n= 8. \*p<0.05 respecto a control. †p<0.07 respecto a control.

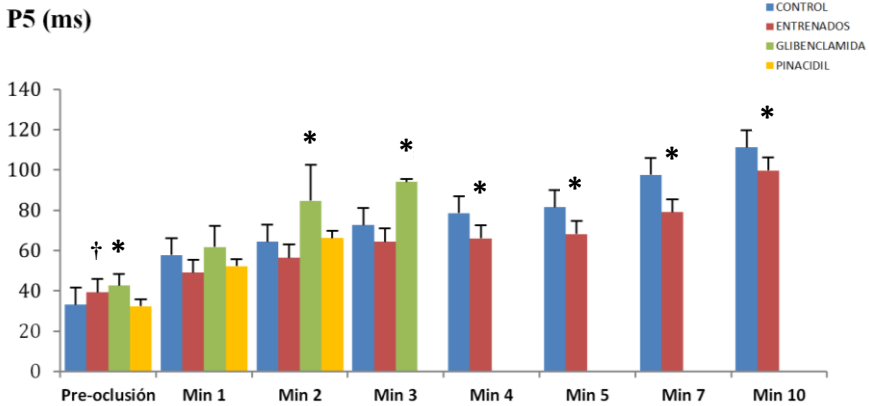
### 3. Resultados

Como se puede apreciar, la longitud del ciclo fibrilatorio en los instantes previos a la oclusión coronaria fue significativamente mayor en los grupos glibenclamida y entrenado que en los grupos control y pinacidil respectivamente ( $66\pm 11$  y  $63\pm 16$  vs  $49\pm 12$  y  $47\pm 12$ ,  $p<0,05$ ). Estos valores se encuentran en consonancia con los obtenidos en el análisis de la FD registrados al final del periodo de estabilización de la FV en condiciones de normal oxigenación y reflejan una menor frecuencia de activación asociada a una mayor refractariedad.

Cuando analizamos el efecto del cese completo de la perfusión coronaria sobre los intervalos fibrilatorios dentro de cada grupo de experimentación, encontramos un incremento significativo de la longitud del referido parámetro en los primeros minutos en los grupos pinacidil (post1:  $118\pm 38$ , post2:  $158\pm 28$   $p<0,05$ ), glibenclamida (post1:  $91\pm 13$ , post2:  $132\pm 25$ , post3:  $153\pm 1$  Hz,  $p<0,05$ ) y control (post3:  $126\pm 12$ , post4:  $146\pm 25$ , post7:  $213\pm 38$  y post10:  $275\pm 69$  Hz  $p<0,05$ ). Sin embargo, en el grupo entrenado se mantuvo la frecuencia de activación en relación al grupo control hasta el final del periodo de isquemia global normotérmica.

#### **3.3.5 Periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular (PRFFV).**

En la figura 3.7 observamos los resultados correspondientes a la media de los periodos refractarios funcionales determinados durante la FV (PRFFV), antes y después de la oclusión coronaria completa.



**Figura 3.7.** PRFFV (P5) en los grupos control, entrenado, glibenclamida y pinacidil, previamente a la oclusión y durante los diez minutos de isquemia global. Las barras de error corresponden al error estándar. \* $p < 0,05$  respecto a control, † $p = 0,075$  respecto a control.

El análisis de los PRFFV en situación previa a la oclusión coronaria, muestra como los valores más elevados del percentil 5 de los intervalos, en situación de normal oxigenación, fueron los de los grupos glibenclamida ( $40 \pm 6$  vs  $33 \pm 6$  ms,  $p < 0,05$ ) y entrenado ( $39 \pm 8$  vs  $33 \pm 6$  ms, † $p = 0,075$ ). El Pct5 representa el intervalo más corto que separa dos respuestas normalmente propagadas durante la arritmia y por tanto, un parámetro representativo de la refractariedad del tejido miocárdico (Duytschaever *et al.*, 2001).

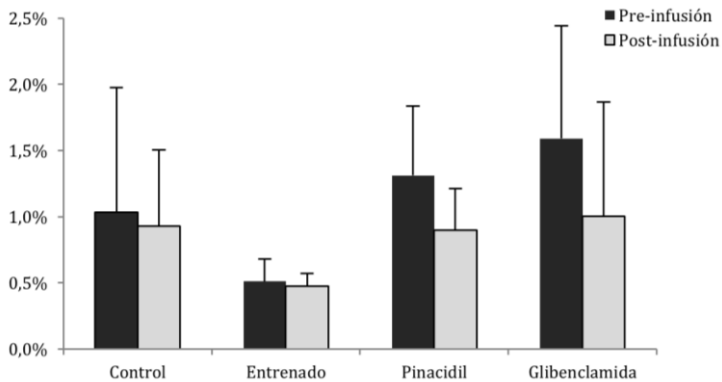
Cuando analizamos el efecto de la oclusión coronaria en la refractariedad durante la FV, encontramos que tras la oclusión coronaria completa, el grupo entrenado exhibió los valores más bajos de pct5, manteniendo la refractariedad durante la isquemia.

### 3. Resultados

#### 3.4 HETEROGENEIDAD MIOCÁRDICA.

##### 3.4.1 Coeficiente de variación del PRFV (CVPRFV).

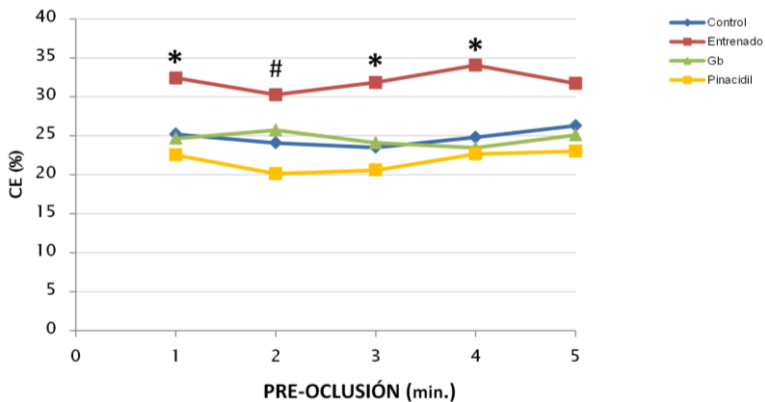
El análisis de la heterogeneidad de los PRFV no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales ni antes de la infusión, ni con posterioridad a la misma (figura 3.9). La ausencia de significación estadística probablemente sea debida a las grandes desviaciones encontradas en las distintas áreas de miocardio ventricular analizado y al hecho de que solamente se pudo determinar este parámetro en un número reducido de casos del grupo pinacidil (puesto que cuatro de los nueve corazones tratados con el abridor de los canales KATP fibrilaron antes de haber alcanzado el periodo refractario funcional ventricular durante la aplicación del TEEV). Sin embargo, los resultados obtenidos en el grupo entrenado sugieren una mayor homogeneidad de los PRFV en el grupo de animales que llevaron a cabo el protocolo de entrenamiento.



**Figura 3.9.** Coeficiente de variación del periodo refractario funcional ventricular antes y después de la infusión. Los valores están expresados en milisegundos. Grupo control, n=10; grupo entrenado, n=11; grupo glibenclamida, n=8 y grupo pinacidil n=5.

### 3.4.2 Concentración espectral (CE) de la FV como parámetro relacionado con la heterogeneidad.

En la figura 3.10 se puede observar la evolución temporal de la CE de la FV durante los 5 minutos de estabilización previos a la oclusión arterial coronaria en los grupos control, entrenado, glibenclamida y pinacidil.



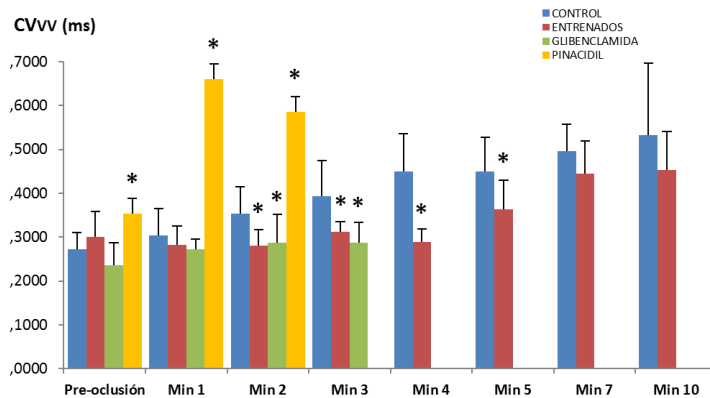
**Figura 3.10.** Evolución de la CE de la FV en los instantes de estabilización de la arritmia previos a la oclusión coronaria. \* $p < 0.05$  respecto a control. # $p = 0.065$  respecto a control.

Se puede apreciar que la concentración espectral es mayor en el grupo entrenado en relación al resto de grupos experimentales: control, glibenclamida y pinacidil (pre ocl. 1:  $32 \pm 4$  vs  $25 \pm 4$  vs  $25 \pm 7$  vs  $23 \pm 2\%$ ,  $p < 0.05$ ; pre ocl. 2:  $30 \pm 5$  vs  $24 \pm 6$  vs  $26 \pm 7$  vs  $20 \pm 4\%$ ,  $p = 0.065$ ; pre ocl. 3:  $32 \pm 3$  vs  $23 \pm 6$  vs  $24 \pm 7$  vs  $21 \pm 5\%$ ,  $p < 0.05$ ; pre ocl. 4:  $34 \pm 5$  vs  $25 \pm 7$  vs  $23 \pm 5$  vs  $23 \pm 3\%$ ,  $p < 0.05$ ; pre ocl. 5:  $32 \pm 8$  vs  $26 \pm 7$  vs  $25 \pm 7$  vs  $23 \pm 7\%$ , n.s). Estos resultados reflejan una mayor homogeneidad y estabilidad electrofisiológicas en la actividad fibrilatoria del grupo entrenado en condiciones de normal oxigenación.

### 3. Resultados

#### 3.4.3 Coeficiente de variación de los intervalos diastólicos del ciclo fibrilatorio (CVvv).

El resultado correspondiente al coeficiente de variación de los intervalos VV (CVvv) se observa en la figura 3.11.



**Figura 3.11.** Coeficiente de variación de los intervalos VV (CVvv), en los grupos control, entrenado, glibenclamida y pinacidil, antes y durante los 10 minutos de isquemia global normotérmica. Grupo control n = 10, grupo entrenado n = 11, grupo glibenclamida n = 9 y grupo pinacidil n = 8. \*p<0,05 respecto a control.

Previamente a la oclusión arterial coronaria, el valor del CVvv en el grupo tratado con pinacidil fue mayor que el del resto de grupos experimentales: control ( $0,36 \pm 0,02$  vs  $0,28 \pm 0,03$  p<0,05), entrenado ( $0,36 \pm 0,02$  vs  $0,30 \pm 0,06$  p<0,05) y glibenclamida ( $0,36 \pm 0,02$  vs  $0,25 \pm 0,18$  p<0,05).

Al analizar la evolución este parámetro durante los diez minutos de cese completo de la perfusión arterial coronaria podemos observar como la heterogeneidad se mantiene en el grupo tratado con glibenclamida durante los primeros minutos y que el grupo entrenado

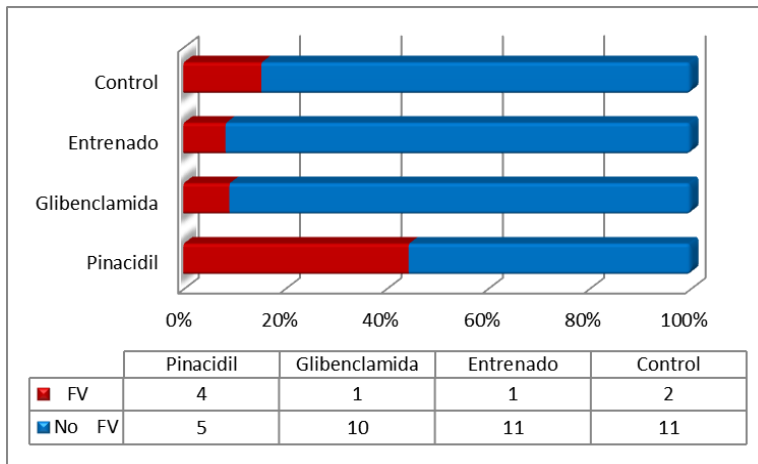


mantuvo la estabilidad electrofisiológicas durante los 5 minutos de isquemia ( $0,45 \pm 0,08$  vs  $0,36 \pm 0,07$ ; min.5  $p < 0,05$ ).

### 3.5 ARRITMOGÉNESIS.

#### 3.5.1 Inducibilidad de la fibrilación ventricular (IFV).

En la figura 3.12 mostramos los resultados referentes a la incidencia de FV durante la aplicación del TEEV. Como podemos observar, en condiciones de normal oxigenación, 4 de los 9 corazones tratados con pinacidil (44,44%) entraron en FV durante la aplicación del mencionado test. Sólo en 2 casos del grupo control (15,38%) y en uno de los grupos entrenado (8,33%) y glibenclamida (9,1%) se desencadenó la arritmia durante la estimulación programada.



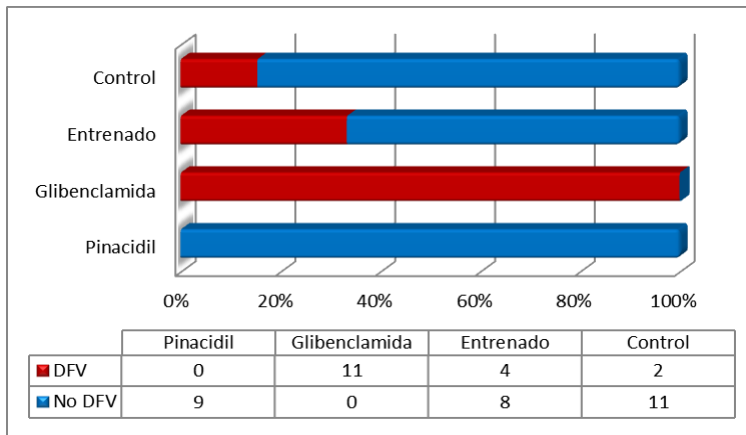
**Figura 3.12.** Detalle en el que se muestra el número de casos de entrada en fibrilación ventricular durante el TEEV. ( $\chi^2(3)=6,056$ ; †  $p=0,109$ ).

### 3. Resultados

Al comparar las incidencias relativas en los cuatro grupos experimentales se encontró que si bien no existe una asociación directa significativa entre la probabilidad de entrada en FV y el grupo experimental ( $\chi^2(3)=6,056$ ;  $\dagger p=0,109$ ), sí que se aprecia una mayor tendencia al desencadenamiento de la arritmia en el grupo tratado con pinacídil. Esta tendencia se acentúa si llevamos a cabo una comparación individualizada entre los grupos entrenado y pinacídil ( $\chi^2(1)=2,854$ ;  $\dagger p=0,084$ ).

#### 3.5.2 Incidencia y tiempo de instauración de desfibrilación espontánea (DFV).

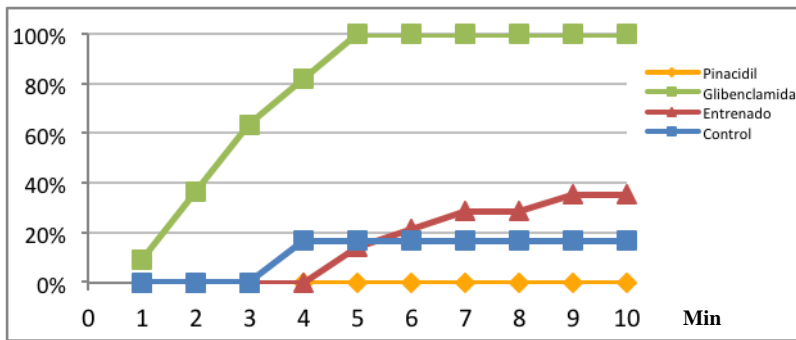
Al analizar la incidencia de DFV durante la isquemia global observamos que en todos los casos del grupo glibenclamida (n=11) revirtió espontáneamente el proceso fibrilatorio, pasando los corazones a ritmo sinusal en los primeros minutos tras el cese de la perfusión.



**Figura 3.13.** Detalle en el que se muestra que en el 100% de los casos del grupo glibenclamida tras la isquemia global se produce desfibrilación espontánea en los primeros instantes tras el cese de la perfusión coronaria ( $\chi^2(3)=31,873$ ;  $*p=0,000$ ).

La comparación entre las incidencias relativas de DFV dentro de los cuatro grupos experimentales (Figura 3.13) también mostró una asociación directa significativa entre la probabilidad de desfibrilación espontánea y el grupo experimental, en este caso, el grupo glibenclamida ( $\chi^2(3)=26,456$ ;  $p<0,001$ ).

En la figura 3.14 se puede apreciar el momento de DFV de los casos registrados en cada grupo experimental. Cabe destacar también los 4 casos (33,33%) de interrupción espontánea del proceso fibrilatorio registrados en el grupo entrenado.



**Figura 3.14.** Frecuencia acumulada de desfibrilación espontánea durante los 10 minutos de isquemia global.

### 3.6 VIABILIDAD ELÉCTRICA.

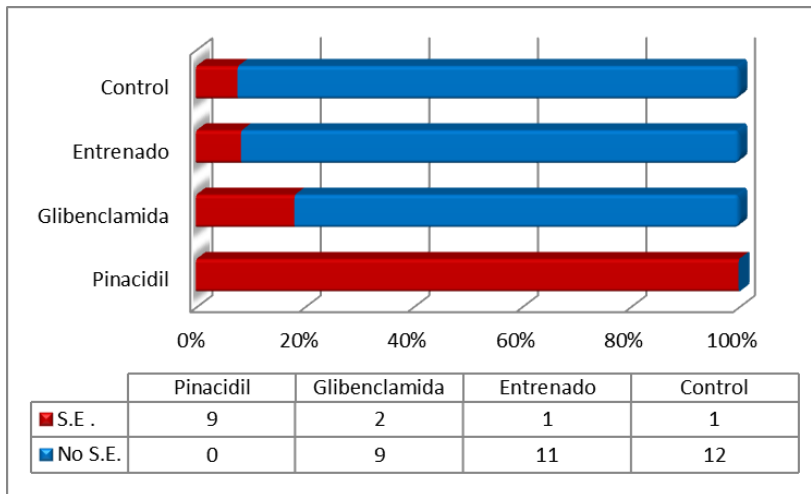
#### 3.6.1 Incidencia y tiempo de instauración de asistolia eléctrica.

Transcurridos cinco minutos desde el desencadenamiento de la FV, se procedió a la oclusión y cese de la perfusión coronaria y se evaluó la viabilidad del tejido determinando la incidencia de asistolia

### 3. Resultados

(ausencia total de actividad eléctrica en los registros electrográficos) durante diez minutos de isquemia global normotérmica.

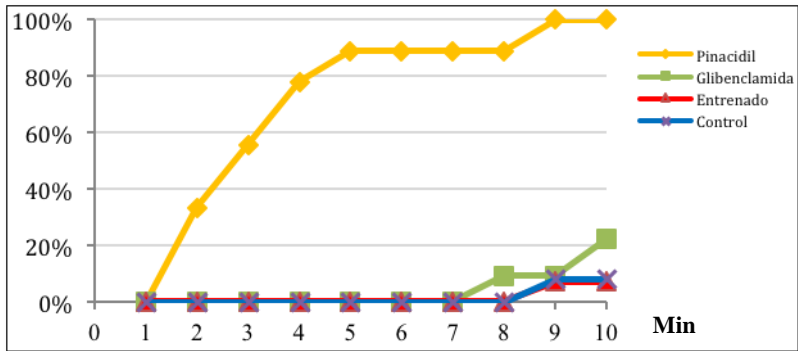
Como se observa en la figura 3.15, en todos los corazones tratados con pinacidil se produjo la pérdida total de actividad eléctrica, o asistolia, dentro del tiempo de isquemia global analizado. Al comparar las incidencias relativas en los cuatro grupos experimentales se encontró, de nuevo, una fuerte asociación directa entre la probabilidad del suceso y el grupo experimental, en este caso, el grupo pinacidil ( $\chi^2(3)=28,079$ ;  $p<0,001$ ).



**Figura 3.15.** Casos en los que se produjo “silencio eléctrico” (SE) en granate, y en los que no se produjo (No SE), en azul, tras la isquemia global, en los diferentes grupos experimentales durante los diez minutos de cese de perfusión coronaria ( $\chi^2(3)=28,079$ ;  $p<0,001$ ).

La figura 3.16 refleja la frecuencia acumulada y el momento de aparición de asistolia eléctrica en los registros electrográficos durante los 10 minutos de isquemia global y se puede apreciar la fuerte

asociación del suceso con el grupo pinacidil, donde el 60% de los corazones entró en inexcitabilidad completa entre el segundo y tercer minuto tras el inicio de la agresión isquémica.



**Figura 3.16.** Frecuencia acumulada de asistolia eléctrica durante los 10 minutos de isquemia global normotérmica.



---

## **4. DISCUSIÓN**





## **4.1 CONSIDERACIONES RELATIVAS A LOS MATERIALES Y MÉTODOS EMPLEADOS.**

### **4.1.1 Respecto al modelo animal utilizado.**

Para el desarrollo de esta investigación hemos utilizado conejos de raza Nueva Zelanda debido a que presentan características electrofisiológicas miocárdicas más aproximadas a las observadas en humanos que las de los pequeños roedores (Panfilov, 2006; Stengl, 2010; Gaustad *et al.*, 2010). Además, las ratas y ratones de laboratorio no representan el modelo más adecuado para el estudio de la fibrilación ventricular, dado que en estos animales resulta difícil el desencadenamiento y mantenimiento de la arritmia, ya que el pequeño tamaño de los corazones carece de la masa crítica necesaria para la formación de los circuitos reentrantes. Su frecuencia cardíaca en reposo es muy elevada y presentan duraciones del potencial de acción muy breves, presentando poca o ninguna dispersión de los periodos refractarios (Billman, 2002). Por otra parte, el conejo resulta idóneo para el estudio de las adaptaciones cardiovasculares producidas por el ejercicio físico, ya que utilizando protocolos adecuados se obtiene una respuesta cardiovascular y signos propios de entrenamiento en poco tiempo (Di Carlo y Bishop, 1990; Such *et al.*, 2002, 2008; Zarzoso *et al.*, 2012; Such-Miquel *et al.*, 2018b).

Otros motivos que justificaron la elección del conejo fueron la posibilidad de perfusión del corazón con soluciones de fácil adquisición y preparación, como el Tyrode, o su óptima manipulabilidad, tanto en los procedimientos quirúrgicos inherentes a esta investigación como en

#### 4. Discusión

la instrumentalización previa al desarrollo del procedimiento electrofisiológico.

##### **4.1.2 Respecto al sistema de perfusión Langendorff.**

El principio básico del sistema de soporte metabólico tipo Langendorff que utilizamos en nuestro modelo experimental de órgano aislado consiste en la perfusión del corazón a través de una cánula insertada en la aorta. Cuando la presión del líquido nutricio alcanza un determinado umbral se cierra la válvula aórtica, desviándose el flujo hacia el sistema coronario. Oscar Langendorff describió la técnica en 1895 y se ha consolidado como uno de los procedimientos metodológicos que mayor avance ha permitido en los conocimientos básicos sobre la función miocárdica, la regulación del flujo sanguíneo coronario y el metabolismo cardíaco (Zimmer, 1998; Riascos *et al.*, 2004). La reproducibilidad, el bajo coste y la posibilidad de excluir factores extrínsecos, como la influencia neurohumoral o la actividad del sistema nervioso central, hacen del sistema Langendorff un modelo ideal para el estudio de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas del miocardio. Además, el hecho de que en el modelo no haya precarga ni postcarga nos permite asegurar que las diferencias observadas entre los grupos no se atribuyen a diferencias en el trabajo cardíaco, sino al efecto de las distintas intervenciones acometidas en los estudios. En el presente, la administración de los distintos fármacos, el entrenamiento y la generación de isquemia global normotérmica.

El sistema permite mantener la perfusión coronaria durante la fibrilación ventricular evitando de ese modo la isquemia asociada. El análisis de las características del patrón fibrilatorio bajo normal

perfusión puede ser utilizado como una herramienta metodológica para el estudio indirecto de propiedades electrofisiológicas miocárdicas y la evaluación de los efectos de distintas intervenciones sobre las mismas (Chorro *et al.*, 2000a, 2003 y 2006). En nuestro grupo de trabajo, utilizando esta herramienta, hemos llevado a cabo estudios de los efectos electrofisiológicos producidos tras la administración de diversos fármacos (Chorro *et al.*, 2000b; Ferrero *et al.*, 2007; Del Canto *et al.*, 2016, 2018; Such-Miquel *et al.*, 2018a), o por la aplicación de distintas manipulaciones como el estiramiento miocárdico local (Chorro *et al.*, 2000c, 2005, 2009; Brines *et al.*, 2012; Del Canto *et al.*, 2016, 2018; Such-Miquel *et al.*, 2018a), lesiones por radiofrecuencia (Chorro *et al.*, 2008; Chorro *et al.*, 2012; Chorro *et al.*, 2013) y cambios de temperatura (Chorro *et al.*, 2002; Tormos *et al.*, 2008), o como es, en el caso de esta investigación, la aplicación de protocolos de ejercicio físico aeróbico (Such *et al.*, 2002, 2008; Zarzoso *et al.*, 2012; Koninckx, 2014; Alves, 2015; Such-Miquel *et al.*, 2018b).

La puesta en marcha del modelo de isquemia global normotérmica que hemos propuesto para esta tesis doctoral, con la inclusión en el sistema del vaso termostático diseñado al efecto, tiene como uno de sus objetivos el de aproximar el estudio de la fibrilación a su desarrollo fisiopatológico habitual, que implica abolición de la perfusión coronaria, aparición de isquemia y deterioro metabólico, fenómenos que por sí mismos, modifican las características del patrón fibrilatorio.

##### **4.1.3 Respecto al protocolo de entrenamiento.**

El protocolo de ejercicio sobre tapiz rodante empleado en esta tesis doctoral ha sido puesto en práctica en diversos estudios sobre adaptaciones electrofisiológicas al entrenamiento desarrollados en nuestro grupo de investigación (Such *et al.*, 2002, 2008; Zarzoso *et al.* 2012; Alves, 2015, Such-Miquel *et al.*, 2018) donde se ha comprobado su efectividad a través de indicadores electrográficos de entrenamiento, como el descenso de la frecuencia cardiaca, tanto *in vivo* (Such *et al.*, 2008) como tras el aislamiento en el sistema de perfusión (Such *et al.*, 2002, 2008; Zarzoso, 2011), o la depresión de la conducción auriculoventricular, manifestada en mayores longitudes del ciclo Wenckebach (Such *et al.*, 2002, Zarzoso, 2011), así como a través de marcadores bioquímicos, como el lactato sanguíneo (Pelechano, 2008; Parra, 2011), el incremento en la expresión miocárdica de proteínas de choque térmico (HSP60) y de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (Gómez-Cabrera *et al.*, 2005; Such *et al.*, 2008) o la mayor actividad de la citrato sintasa registrada en el sóleo de los conejos entrenados (Marchio *et al.*, 2016).

La investigación llevada a cabo en conejos ha sido más escasa que en otros modelos animales. En cuanto a los protocolos de entrenamiento usados han sido heterogéneos, encontrándose en la literatura protocolos tanto continuos (Chen y Li, 1993; Carroll, 2003; Becker *et al.*, 2004; de Moraes *et al.*, 2008) como “interválicos” (Meng y Pierce, 1990; Such *et al.*, 2002, 2008) con un rango de intensidades variables. Además, se han encontrado discrepancias en cuanto a la tolerancia de los conejos de laboratorio para la carrera. Mientras que en

investigaciones como las llevadas a cabo por Faris *et al.*, (1982) o Jover *et al.*, (1987) encontraron dificultades para entrenar a los animales a velocidades superiores a los  $13 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  durante más de dos minutos, otros autores hemos observado una mayor capacidad para la realización de ejercicio físico aeróbico en conejos de raza Nueva Zelanda (Such *et al.*, 2002, 2008; Zarzoso *et al.*, 2012; Such-Miquel *et al.*, 2018b) e incluso se ha descrito que estos animales son capaces de realizar carrera continua en cinta rodante a velocidades de  $15\text{-}18 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta 60 minutos seguidos (Gao *et al.*, 2007, de Moraes *et al.*, 2008). Las razones a las que podría deberse esta disparidad de apreciaciones en el comportamiento del conejo al correr en tapiz rodante podrían estar relacionadas con la raza utilizada, con factores comportamentales o simplemente con el tipo de manipulación a las que son sometidos, ya que estos animales son extremadamente sensibles y pueden estresarse con facilidad.

#### **4.1.4 Respecto a la metodología para la determinación de los parámetros electrofisiológicos.**

El análisis de los parámetros electrofisiológicos determinados en el presente trabajo de investigación ha sido posible gracias al uso de métodos de cartografía epicárdica de la actividad eléctrica cardiaca. Se han estudiado propiedades electrofisiológicas como la refractariedad y la heterogeneidad miocárdicas en condiciones de normal oxigenación, así como su evolución durante un periodo de isquemia global normotérmica dentro de los cuatro grupos experimentales propuestos.

El hecho de haber usado una placa multielectrodo nos ha permitido obtener registros en más de doscientos cuarenta puntos del

#### 4. Discusión

epicardio ventricular lo que nos ha permitido, además de conocer la evolución de las señales eléctricas en una amplia zona del ventrículo izquierdo, acometer el estudio de la dispersión espacial de los parámetros electrofisiológicos estudiados a través del cálculo de los respectivos coeficientes de variación.

El test del extraestímulo ventricular (TEEV), un método clásico para la determinación de los periodos refractarios, tanto en la clínica como en experimentación (García *et al.*, 2007), ha sido utilizado en esta ocasión, además de para valorar la refractariedad en condiciones de normal oxigenación, para el estudio de la arritmogénesis e inducibilidad de la fibrilación ventricular, puesto que como hemos argumentado con anterioridad, bajo ciertas circunstancias en las que la excitabilidad del miocardio se encuentra modificada, la simple aplicación del mencionado test puede desencadenar la arritmia.

Como hemos explicado, el análisis de la fibrilación ventricular sin interrumpir la perfusión, puede ser utilizado como un instrumento metodológico para el estudio indirecto de diversas propiedades electrofisiológicas, en los más de 240 puntos en los que se adquiere la señal de la actividad eléctrica epicárdica durante la arritmia. La cartografía epicárdica de la activación ventricular empleando electrodos múltiples para el registro de los potenciales extracelulares (Brugada *et al.*, 1990; Cha *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 1999) permite captar los cambios del potencial trans-membrana de grupos de células próximas entre sí aportando información sobre las características de la activación miocárdica durante las arritmias ventriculares y permitiendo la objetivación de los patrones de activación durante la fibrilación y la

existencia de activación reentrante en el inicio y durante la evolución de la arritmia (Cha *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1995; Kwan *et al.*, 1998; Witkowski *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 1999; Efimov *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 1999; Chorro *et al.*, 2000; citados por Del Canto, 2014).

El análisis del periodo refractario ventricular en condiciones de normal oxigenación durante la fibrilación lo hemos determinado a través de los análisis de estos registros utilizando técnicas, tanto en el dominio del tiempo como en el de la frecuencia. Así, hemos determinado el percentil 5 (pc5) del histograma de longitudes de ciclo de la fibrilación ventricular, intervalos VV, cuyo valor es utilizado como expresión del periodo refractario funcional durante la activación ventricular en fibrilación. (Duytschaever *et al.*, 2001). La determinación del periodo refractario funcional a través de este método, permite excluir la estimulación externa que caracteriza al test del extraestímulo ventricular.

Hemos llevado a cabo técnicas espectrales para el análisis de la activación del miocardio ventricular durante la FV. Estos métodos basados en el análisis del dominio de la frecuencia examinan la distribución de la energía de los electrogramas como una función de la frecuencia (Ropella, 2001). Para el análisis espectral se ha usado la transformada rápida de Fourier. El análisis de Fourier es un método no paramétrico que descompone las señales en una suma de componentes sinusoidales. El análisis en el dominio de la frecuencia no siempre proporciona una estimación mejor o más fiable de la frecuencia de activación ventricular que el análisis en el dominio del tiempo; concretamente cuando el electrograma presenta fraccionamiento,

#### 4. Discusión

potenciales dobles, ruido, o una marcada disminución de la amplitud como ocurre en la isquemia miocárdica (Alves, 2015).

### **4.2 CONSIDERACIONES RELATIVAS A LOS RESULTADOS OBTENIDOS.**

#### **4.2.1 Respecto al cronotropismo sinusal.**

El incremento significativo de la longitud del ciclo sinusal observado en el grupo entrenado reproduce resultados previos obtenidos por nosotros (Such *et al.*, 2008; Pelechano, 2008) y vuelve a evidenciar efectos del entrenamiento sobre el automatismo cardíaco intrínseco. La bradicardia del deportista es un fenómeno que ha sido ampliamente estudiado y que tradicionalmente se ha explicado por el incremento de la actividad parasimpática en reposo. La acetilcolina, al unirse a los receptores muscarínicos promovería la apertura de los canales de potasio que vehiculan la corriente  $IK_{ACh}$  produciendo una rápida la hiperpolarización de las células marcapasos del nodo SA e incrementando, por tanto, el tiempo necesario para alcanzar el umbral de excitación (Jalife *et al.*, 2009). A su vez, el mencionado neurotransmisor, actuaría reduciendo la pendiente de despolarización espontánea del nodo a través de la inhibición de las corrientes de entrada  $ICaL$  e  $I_f$  contribuyendo de ese modo al enlentecimiento de la frecuencia de disparo de las células marcapasos (Snyders, 1999; Levick, 2010). Sin embargo, dado que estas modificaciones se mantienen en el corazón aislado (no sujeto, por tanto, a influencias neuro-humorales extrínsecas) y se ha demostrado que son independientes de la actividad de las neuronas postganglionares parasimpáticas (Zarzoso *et al.*, 2012),



deben existir mecanismos adicionales de carácter intrínseco que contribuyan a esta adaptación cardiaca. Se ha sugerido que la optimización del metabolismo energético podría participar al propiciar una utilización y generación más eficiente de la energía (Katona *et al.*, 1982). También se ha investigado el efecto que podría derivarse de modificaciones mecánicas en el corazón. Lewis *et al.* (1980) sugirieron que el estiramiento tónico de las células del nodo sinoauricular, que se produciría durante la hipertrofia asociada al entrenamiento, podría contribuir al enlentecimiento de la frecuencia cardiaca.

#### **4.2.2 Respecto a la conducción aurículoventricular.**

Otra de las adaptaciones cardiacas que se producen a causa del entrenamiento y que ha sido ampliamente documentada es la depresión de la conducción aurículoventricular. Se ha comprobado la aparición de bloqueos tipo I y, ocasionalmente, tipo II, en deportistas de élite (Talan *et al.*, 1982, Viitasalo *et al.*, 1982 y Viitasalo *et al.*, 1984, citados por Such *et al.*, 2002). Las diferencias que hemos encontrado en la determinación de la longitud del intervalo AV reproducen también resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, que evidenciaron una depresión de la conducción AV manifestada por un incremento de la longitud de ciclo de Wenckebach (Such *et al.*, 2002; Zarzoso *et al.*, 2012). Este efecto se ha atribuido, generalmente también, al aumento del tono parasimpático (Northcote *et al.*, 1989; Bjorstad *et al.*, 1993) y a la participación de los nervios colinérgicos que a través de varios mecanismos, proporcionarían estímulos inhibidores que terminarían por reducir la corriente de entrada de calcio, produciendo como resultado una respuesta dromotrópica negativa en la conducción

#### 4. Discusión

auriculoventricular. Sin embargo, el bloqueo colinérgico mediante administración de atropina que se llevó a cabo en la investigación de Zarzoso *et al.*, (2012) tampoco modificó significativamente la conducción, lo que parece indicar que la actividad colinérgica del sistema nervioso intrínseco cardíaco no participaría tampoco en esta respuesta adaptativa al entrenamiento.

Algunos autores sugieren que los bloqueos de conducción podrían deberse del mismo modo a alteraciones mecánicas y morfológicas consecuencia de la práctica habitual de ejercicio aeróbico, como la dilatación de las cámaras cardíacas, hecho que influiría tanto en el inicio como en la propagación de la excitación (Kohl *et al.*, 1999), o incluso a daño miocárdico producido durante el entrenamiento. Sin embargo, en nuestra investigación, las modificaciones encontradas no parecen estar ligadas a una hipertrofia miocárdica, ya que no hemos encontrado diferencias en el peso de los corazones entre los diferentes grupos experimentales, ni existen evidencias que nos hagan sospechar de daño miocárdico producido por estrés oxidativo ya que utilizando un protocolo de mayor intensidad no se encontraron incrementos en los respectivos marcadores (Such *et al.*, 2002).

##### **4.2.3 Respecto a la refractariedad miocárdica.**

El protocolo electrofisiológico diseñado para esta tesis doctoral y la puesta en marcha del modelo de isquemia global normotérmica nos ha permitido evaluar la refractariedad en condiciones de normal oxigenación, tanto de forma directa, a través de la utilización de tests en ritmo estimulado (TEEV), como de forma indirecta mediante técnicas de análisis de la señal fibrilatoria en el dominio del tiempo y de la

frecuencia. El análisis de los trazados utilizando técnicas de procesamiento digital de señales y en ausencia del componente de deterioro metabólico asociado a la isquemia, aporta, como se ha detallado en el apartado correspondiente, información relacionada con los ciclos de activación durante la arritmia y permite la extracción de información indirecta sobre las propiedades electrofisiológicas del tejido analizado. Utilizando la transformada rápida de Fourier podemos descomponer la señal fibrilatoria en sus distintos armónicos e identificar la senoide que coincide con el armónico de mayor amplitud el cual representa la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular (FD). La FD de la fibrilación ventricular se encuentra relacionada de forma inversa con los períodos refractarios, por lo que su estudio representa un instrumento con el que evaluar la excitabilidad del tejido y conocer de manera indirecta la refractariedad miocárdica (Chorro *et al.*, 2000; Ropella, 2001). También hemos podido determinar el periodo refractario ventricular durante la fibrilación en condiciones de normal oxigenación a través del análisis de los registros en el dominio del tiempo. A partir del percentil 5 del histograma de longitudes de ciclo de la fibrilación ventricular (intervalos VV) hemos obtenido un valor indicador aproximado del periodo refractario funcional durante la activación ventricular fibrilatoria (Duytschaever *et al.*, 2001). La caracterización de la excitabilidad durante la arritmia en condiciones de normal oxigenación, como hemos comentado con anterioridad, permite evidenciar efectos del entrenamiento, y en esta ocasión de la distinta modulación de los canales KATP, sobre las propiedades miocárdicas relacionadas con la refractariedad.

#### 4. Discusión

Si bien la comparación de las diferencias observadas en los periodos refractarios efectivos y funcionales ventriculares obtenidos en ritmo estimulado (TEEV) no alcanzó grado de significación estadística, el estudio de la señal fibrilatoria durante la estabilización previa al cese de la perfusión coronaria, utilizando ambas técnicas de análisis digital de señales, ha mostrado una mayor estabilidad eléctrica en los corazones procedentes de animales entrenados coincidente con resultados previos publicados por nuestro grupo de investigación (Such *et al.*, 2002, 2008; Zarzoso *et al.*, 2012; Such-Miquel *et al.*, 2018b), y en esta ocasión, también en aquellos sometidos a bloqueo farmacológico de los canales KATP (grupo glibenclamida).

La refractariedad es una propiedad que refleja la excitabilidad del tejido cardiaco y su estudio, como parámetro susceptible de modificación a través del ejercicio físico crónico, resulta de importancia en nuestra investigación debido a su posible relación con la arritmogénesis. Como hemos comentado en la introducción, el producto de la refractariedad por la velocidad de conducción determina la longitud de onda del proceso de activación miocárdico, factor, a su vez, estrechamente relacionado con la aparición, la estabilización y el cese de las arritmias por reentrada (Wijffels *et al.*, 1995). En ausencia de modificaciones en la velocidad de conducción, un incremento de la refractariedad aumentaría la longitud de onda del proceso de activación miocárdico, dificultando el desarrollo y estabilización de los circuitos reentrantes.

Se ha demostrado, a través de diferentes metodologías experimentales, que el entrenamiento físico aumenta la duración del

potencial de acción (Tibbits *et al.*, 1981, Gwathmey *et al.*, 1990, Mokolke *et al.*, 1997, Natali *et al.*, 2002; citados por Zarzoso, 2011) y que este incremento se correlaciona de forma directa con la refractariedad en circunstancias de normal perfusión (Wu *et al.*, 2006) perdiéndose esta relación durante la isquemia miocárdica (Sutton *et al.*, 2000).

Resultados de trabajos precedentes llevados a cabo en nuestro grupo de investigación han confirmado el incremento de la refractariedad ventricular en los corazones de los animales entrenados (Such *et al.*, 2002, 2008; Zarzoso *et al.*, 2012; Koninckx, 2014; Such-Miquel *et al.*, 2018b), que en nuestra opinión, podría contribuir, al menos en parte, al efecto antiarrítmico del ejercicio físico que ha llevado a algunos autores a proponer su práctica regular como intervención no farmacológica frente a la aparición de determinados tipos de arritmias (Billman, 2002).

Diversos estudios han relacionado el incremento de la refractariedad ventricular con la estimulación parasimpática (Martins y Zipes, 1980; Prystowsky *et al.*, 1981; Inoue y Zipes, 1987; Morady *et al.*, 1988; Litovsky y Antzelevitch, 1990; Ellenbogen *et al.*, 1990; Shimizu *et al.*, 1994; citados por Zarzoso, 2011). Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Zarzoso *et al.* (2012), cuya hipótesis de partida era que el incremento de la refractariedad ventricular observado en el corazón aislado de animales entrenados podía estar mediado por la acción sobre la corriente de salida de potasio dependiente de ACh (*I<sub>K</sub>Ch*), se descartó la participación del sistema nervioso parasimpático intracardiaco al no encontrar modificaciones en el incremento

#### 4. Discusión

de la refractariedad por el ejercicio tras la administración de atropina en el grupo entrenado. En esta investigación se contribuyó también a demostrar que estas modificaciones son, al menos en parte, de carácter intrínseco dado que se mantienen en el corazón aislado (no sometido a influencias neurohumorales) y son independientes de la actividad de las neuronas postganglionares parasimpáticas (Zarzoso *et al.*, 2012; Such-Miquel *et al.*, 2018).

Otros mecanismos que han sido propuestos y que podrían explicar el incremento de la refractariedad producido por el entrenamiento, afectarían a las corrientes repolarizantes de potasio. Así, Jew *et al.*, (2001), utilizando técnicas de patch-clamp, encontraron que la densidad de las corrientes repolarizantes de  $K^+$  de inactivación lenta se encontraban reducidas en el grupo de animales entrenados, hecho que podría contribuir al alargamiento de la duración del potencial de acción observado en miocitos aislados de animales entrenados (Tibbits *et al.*, 1981; Gwathmey *et al.*, 1990; Natali *et al.*, 2002). Sin embargo, en la misma investigación observaron un incremento de la corriente transitoria de salida de  $K^+$ ,  $I_{to}$ , responsable de repolarización rápida en la fase 1 del potencial de acción.

Los movimientos de calcio a través de la membrana también podrían estar implicados en el alargamiento de la duración del potencial de acción miocárdico producido por el entrenamiento físico y han sido objeto de investigación. Mokolke *et al.*, (1997) intentaron determinar si el entrenamiento producía cambios a nivel de la corriente lenta de entrada de calcio ( $ICaL$ ), tal y como parecían indicar las alteraciones encontradas en el movimiento general del ion en miocitos aislados de

ratas sometidas a entrenamiento físico (Tibbits *et al.*, 1981; Gwathmey *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1993). Sin embargo, no encontraron cambios en las características electrofisiológicas de estas corrientes tras el programa de entrenamiento, descartando la participación de  $ICaL$  en el alargamiento del potencial de acción. Otra posible explicación de la prolongación del potencial de acción producida por el entrenamiento físico podría encontrarse en la actividad del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , que tiene propiedades electrogénicas. Efectivamente, un incremento en la actividad de este intercambiador, que tiende a incrementar la electropositividad intracelular durante su funcionamiento habitual, produciría un alargamiento de la refractariedad miocárdica. Mace *et al.* (2003), llevaron a cabo un estudio para analizar los efectos del entrenamiento sobre la actividad de dicho intercambiador en un modelo murino pero tampoco encontraron modificaciones por lo que este sistema tampoco parece contribuir al incremento de la duración del potencial de acción. Tamargo *et al.*, (2003) estudiaron por su parte la corriente rectificadora de entrada de  $K^+$ ,  $IK_1$ . Esta corriente es responsable de las fases de repolarización finales y del mantenimiento del potencial de membrana en reposo (fase 3 y 4), por lo que según algunos autores, su modulación podría tener un profundo efecto sobre la excitabilidad cardíaca y la arritmogénesis (Dhamoon y Jalife, 2005).

El protocolo electrofisiológico diseñado para esta tesis doctoral comprende numerosas pruebas en ritmo estimulado (TEEV a distintas longitudes de ciclo de estimulación y estimulación a frecuencias fijas, antes y después de la infusión de fármacos, junto a la estimulación a frecuencias crecientes para el desencadenamiento de la FV) que pueden resultar exigentes para el miocardio y representar un cierto estrés

#### 4. Discusión

metabólico. Si bien es cierto que los canales  $K_{ATP}$  no deberían activarse en condición de normal oxigenación, cada vez se encuentra más extendida la idea de que estos canales participarían en el acortamiento de la duración del potencial de acción (y posiblemente de la refractariedad) que sobreviene durante el ejercicio intenso (Nakaya, 2014). La mayor refractariedad estimada en los grupos entrenado y tratado con glibenclamida en el análisis de la señal fibrilatoria durante la estabilización previa a la oclusión del sistema coronario (FD, intervalos VV, pc5) apuntaría, en este caso, a un efecto de bloqueo de los canales derivado del periodo de entrenamiento. En nuestra opinión, el mayor periodo refractario ventricular de los corazones procedentes de los animales entrenados y de aquellos tratados con el bloqueante de los canales  $K_{ATP}$ , previamente a la oclusión coronaria, podría representar uno de los mecanismos básicos a través del cual la realización de ejercicio físico aeróbico ejercería un efecto protector frente a las arritmias por reentrada y la muerte súbita y podría 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).

La apertura de los canales de potasio ATP-dependientes a través de la administración de pinacidil, por el contrario, acortó el periodo refractario determinado tanto en ritmo estimulado (TEEV) como durante la fibrilación ventricular. Ha sido publicado que la activación de la corriente  $I_{K_{ATP}}$  acorta la duración del potencial de acción cardíaco por su efecto repolarizante, reduciendo la entrada de calcio, preservando los niveles de ATP e incrementando la supervivencia celular durante la isquemia miocárdica (ver revisiones: Powers *et al.*,



2008; Li y Dong, 2010). Ha sido observado, asimismo, que la activación de dicha corriente en condiciones de normal oxigenación, tras la administración de agonistas del canal KATP, provoca la reducción de la duración del potencial de acción y del periodo refractario (Smallwood y Steinberg, 1988; Wilde *et al.*, 1990) a través de una fuga de potasio que se produce de manera heterogénea a lo largo del tejido miocárdico y que tiene como consecuencia una mayor dispersión de los procesos de repolarización y la conformación de un sustrato arritmogénico (Chi, 1990; Di Diego y Antzelevitch, 1993; Billman, 2006; Quintanilla *et al.*, 2013). El estudio de la señal fibrilatoria durante la estabilización previa al cese de la perfusión coronaria, utilizando técnicas de análisis digital de señales, tanto en el dominio del tiempo como en el de la frecuencia ha mostrado en el periodo de estabilización de la arritmia previo al cese de la perfusión coronaria, los intervalos fibrilatorios (intervalos VV) más breves en los grupos control y pinacidil, lo que indicaría un alto grado de excitabilidad en condición de normoxia.

La evolución de este parámetro durante los diez minutos de isquemia global ha aportado información adicional sobre el estado metabólico de los corazones durante la agresión isquémica. El análisis de los registros evidenció una preservación significativa de la refractariedad en el grupo entrenado frente al resto de grupos experimentales que podría explicarse por la optimización de los sistemas metabólicos y de reserva energética que se producen durante los periodos de entrenamiento y que representan una ventaja para afrontar los efectos de la agresión por isquemia-reperusión (Bersohn y Scheuer, 1978; Bowles *et al.*, 1992; Bowles y Starnes, 1994). Si bien,

#### 4. Discusión

como hemos remarcado, el incremento de la refractariedad en condiciones de normal oxigenación puede considerarse un factor antiarritmogénico, el incremento de la misma tras la oclusión coronaria, dejaría de exhibir este carácter beneficioso, ya que bajo estas condiciones se asociaría a una manifestación de deterioro metabólico. Por ello, interpretamos el mantenimiento de la refractariedad como un efecto protector del ejercicio físico crónico. El aumento de la refractariedad apreciado en todos aquellos parámetros relacionados con la misma, como la media y el pct5 de los intervalos VV (aproximación del periodo refractario funcional) o la disminución de la FD de la señal fibrilatoria que observamos en los grupos control, glibenclamida y pinacidil, lo consideramos, tal y como acabamos de comentar, como un efecto de deterioro derivado de la deprivación circulatoria (“a tejido muerto, percentil 5 infinito”). Strohmenger *et al.*, (1997) relataron que la isquemia secundaria a la fibrilación ventricular resultaba en un rápido agotamiento de los fosfatos de alta energía del miocardio, al deterioro de los potenciales transmembrana y a la sobrecarga de calcio intracelular, que a su vez, se manifestaba por una caída de la frecuencia de la fibrilación ventricular. Describieron también cómo se incrementaban la probabilidades de una evolución favorable después de la desfibrilación cuando los valores de la frecuencia dominante de se mantenían tras la isquemia global del miocardio (Stewart *et al.*, 1992; Strohmenger *et al.*, 1994; Brown y Dzwonczyk, 1996; citados por Strohmenger *et al.*, 1997). De modo similar, estudios previos realizados por nosotros evidenciaron la caída de la frecuencia dominante de la fibrilación tras la oclusión coronaria, que sin embargo, se mantuvo tras el entrenamiento (Such-Miquel *et al.*, 2007). El rápido aumento de la refractariedad tras la oclusión coronaria en los grupos tratados con

pinacidil y glibenclamida parece indicar también deterioro al menos en lo que al estatus metabólico se refiere. Curiosamente nos hemos encontrado con casos de desfibrilación espontánea en el grupo tratado con glibenclamida y la asistolia eléctrica en el grupo tratado con pinacidil. La apertura del canal y no el bloqueo del mismo, ejerce, según la mayoría de autores, un efecto protector sobre el miocardio isquémico. Los efectos se manifestarían en el ahorro energético y la reducción de la lesión miocárdica (Lederer *et al.* 1989; Gross y Auchampach, 1992; Gross y Peart, 2003; Powers *et al.*, 2008; Li y Dong, 2010). Sin embargo, nuestras observaciones a nivel electrofisiológico, indican la pérdida o ausencia total de actividad eléctrica de todos los corazones tratados con pinacidil dentro del tiempo de isquemia global analizado, lo que sin duda indica deterioro electrofisiológico. Por su parte, el bloqueo del canal ha mostrado durante la isquemia un claro efecto antiarrítmico en nuestro modelo con la desfibrilación espontánea también de todos los corazones.

#### **4.2.4 Respecto a la heterogeneidad electrofisiológica.**

Como hemos reiterado en la introducción, el miocardio es un sincitio funcional, heterogéneo desde el punto de vista electrofisiológico, lo que se traduce en diferentes propiedades eléctricas de membrana a lo largo del territorio cardíaco. La heterogeneidad es inherente al tejido cardíaco y resultado de la distinta densidad y distribución de canales iónicos, de las conexiones intercelulares y de la estructura y arquitectura tisular. Estas variaciones fisiológicas se acentúan durante la remodelación del tejido enfermo o en situaciones patológicas, como es el caso de la isquemia, lo que resulta determinante

#### 4. Discusión

la aparición de bloqueos en la conducción y dispersión espacial de la repolarización (Kléber y Rudy, 2004), factores determinantes para la formación de ondas de reentrada y su perpetuación en determinados tipos de arritmias cardíacas (para revisión ver cita de Jalife, 2000).

Los índices o parámetros de heterogeneidad electrofisiológica que hemos analizado en este trabajo de investigación han sido: el coeficiente de variación de los periodos refractarios funcionales ventriculares (CVPRFV) obtenidos durante la aplicación del TEEV en situación de normoxia; la concentración espectral (CE) de la señal fibrilatoria y su evolución temporal durante los cinco minutos de estabilización de la arritmia previos al cese completo de la perfusión coronaria y la instauración de condiciones de isquemia global y el coeficiente de variación de la longitud del ciclo fibrilatorio (CVVV) tanto en los instantes previos a la oclusión como durante los diez minutos de isquemia global con el fin de investigar el efecto del ejercicio físico crónico y la distinta modulación de los canales KATP sobre esta propiedad, tanto en el miocardio oxigenado como en el sometido a isquemia global normotérmica.

En la determinación del coeficiente de variación de los periodos refractarios funcionales ventriculares (CVPRFV), determinados durante las pruebas realizadas en ritmo estimulado, no hemos encontrado diferencias entre los diferentes grupos experimentales. Pese a que diferentes autores han puesto de manifiesto el efecto de la apertura del canal KATP sobre la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio, y pese a la aparente mayor homogeneidad de los PRFV en el grupo entrenado, evidenciada a través de este novedoso índice para la

estimación de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio ventricular, desarrollado expresamente para esta tesis doctoral, el análisis estadístico no ha resultado significativo. Consideramos que las grandes desviaciones encontradas entre las diferentes zonas seleccionadas y el hecho de que solamente se pudo determinar este parámetro en un número reducido de casos del grupo pinacidil (puesto que cuatro de los nueve corazones tratados con el abridor de los canales KATP fibrilaron antes de haber alcanzado el periodo refractario funcional ventricular durante la aplicación del TEEV) pueden haber influido en la ausencia de variaciones significativas entre grupos en el CVPRFV.

Por el contrario, el análisis de la heterogeneidad durante la fibrilación ventricular, sí ha arrojado diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales, tanto en condición de normal oxigenación como durante los diez minutos de isquemia global. Previamente al cese de la perfusión coronaria, en el análisis espectral de los trazados fibrilatorios durante los cinco minutos de estabilización de la arritmia bajo condiciones de normal oxigenación (240 electrodos epicárdicos), encontramos diferencias de heterogeneidad entre los corazones procedentes de los conejos entrenados y en los del resto de grupos experimentales. Las técnicas espectrales que hemos utilizado para el análisis de la activación del miocardio ventricular durante la FV están basadas en técnicas desarrolladas en el dominio de la frecuencia y examinan la distribución de la energía contenida en los electrogramas (Ropella, 2001). Mediante la transformada rápida de Fourier es posible descomponer la señal fibrilatoria en suma de componentes sinusoidales definiéndose la concentración espectral (CE) como el cociente del área

#### 4. Discusión

del espectro de potencia contenida en el intervalo  $FD \pm 0,5\text{Hz}$  dividido por el área total del espectro de potencia de la señal.

Se trata de un parámetro utilizado frecuentemente en nuestros estudios electrofisiológicos que aporta información acerca de la regularidad de la señal fibrilatoria. Cuanto más concentrada alrededor de la FD sea la distribución de los armónicos que componen la señal fibrilatoria, más regular y homogénea será la activación eléctrica epicárdica. En el análisis de la evolución temporal de este parámetro durante los cinco minutos de estabilización de la fibrilación inducida previos al cese de la perfusión coronaria, la concentración CE de los registros obtenidos en los corazones procedentes de animales que habían seguido el protocolo de entrenamiento fue mayor que la de las señales obtenidas en el resto de los grupos experimentales evidenciando una activación más regular durante la FV en condiciones de normal oxigenación. Estos resultados se encuentran en sintonía con los de otros trabajos precedentes llevados a cabo en nuestro grupo de investigación en los que se analizó el coeficiente de variación de la frecuencia dominante de la fibrilación o la complejidad de la activación eléctrica durante la arritmia (Pelechano *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2012; Such-Miquel *et al.*, 2018b) y que evidencian un posible efecto estabilizador del ejercicio físico sobre la heterogeneidad electrofisiológica intrínseca del miocardio.

Las investigaciones realizadas en esta dirección parecen apuntar a que el ejercicio aeróbico podría alterar favorablemente determinadas propiedades cardíacas que condicionan la estabilidad eléctrica llegando algunos autores a proponer programas de ejercicio físico como

maniobra antiaritmica no farmacológica frente a la muerte súbita de origen cardiaco (Billman, 2002). Sin embargo, los mecanismos precisos a través de los cuales el entrenamiento puede operar sobre la heterogeneidad fisiológica del miocardio son todavía objeto de investigación. Se ha propuesto la expresión diferencial de canales repolarizantes de potasio, canales tardíos de sodio e intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , entre otros. Aunque la dispersión espacial de gradientes electroquímicos reviste una importancia crucial en los procesos de iniciación de reentradas, las investigaciones en este campo son todavía escasas (Allessie *et al.*, 1976; citados por Kléber y Rudy, 2004). Asimismo, se han descrito heterogeneidades fisiológicas en la conducción del impulso eléctrico que afectan a la velocidad de propagación. Nosotros pensamos, que el entrenamiento podría homogeneizar, en el corazón en situación de normoxia, aquellos mecanismos implicados en propiedades tales como la refractariedad y la velocidad de conducción; canales, sistemas de transporte, y quizás a las mismas propiedades de las membranas como cable.

Resaltamos, por otra parte, que en el grupo tratado con pinacidil, la heterogeneidad, como expresión del CVVV fue mayor que en el resto de grupos experimentales previamente a la oclusión arterial coronaria. También la heterogeneidad tras la oclusión arterial coronaria ha sido mayor en el grupo tratado con el abridor de los canales  $\text{KATP}$  que los correspondientes a los grupos control, glibenclamida y entrenado. El efecto electrofisiológico de la apertura del mencionado canal ha resultado contrario al observado en 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

#### 4. Discusión

en la isquemia aguda, a través de una mayor actividad de la corriente vehiculada por los canales KATP. Sin embargo, la similitud en el comportamiento del grupo entrenado y del tratado glibenclamida en el mantenimiento y la estabilidad de este parámetro durante la isquemia global permite considerar la posibilidad de que el entrenamiento haya podido operar a través del bloqueo del canal KATP. Efectivamente, los efectos del entrenamiento, así como los debidos a la administración de glibenclamida, en lo que se refiere a heterogeneidad electrofisiológica, parecen coincidir tras la oclusión arterial coronaria.

##### **4.2.5 Respecto a la inducibilidad de la fibrilación ventricular.**

Se ha constatado en numerosos modelos experimentales que la activación farmacológica de los canales KATP, incluso en condiciones de normal perfusión, crea un sustrato favorable que predispone al miocardio para el desencadenamiento de arritmias por reentrada (Chi *et al.*, 1990; Di Diego y Antzelevitch, 1993; Quintanilla *et al.*, 2013). El test del extraestímulo ventricular (TEEV) es un método clásico utilizado tanto en la clínica como en la experimentación para el estudio del periodo refractario efectivo y funcional de diversos territorios miocárdicos (García *et al.*, 2007). En el presente trabajo, el TEEV además de para la determinación de la refractariedad ventricular, ha constituido un método con el que investigar la inducibilidad de la fibrilación ventricular, ya que en circunstancias en las que la excitabilidad del tejido se encuentra incrementada, la aplicación del mencionado test puede llegar a desencadenar la arritmia. Si bien no hemos encontrado significación estadística, sí hemos observado una tendencia a una mayor incidencia de fibrilación tras la aplicación de



extraestímulos en el grupo pinacidil (el 44,44% de los casos) respecto al resto de grupos experimentales, en particular respecto al grupo entrenado ( $p=0.084$ ). Investigaciones previas realizadas en el grupo sí arrojaron diferencias estadísticamente significativas tras el análisis de este parámetro, esta vez en un modelo de isquemia regional aguda, donde el 68% de los corazones tratados con el abridor de los canales entró en fibrilación durante la utilización del TEEV (Alves, 2015). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores que utilizando diferentes fármacos activadores del canal como el cromakalim (Uchida *et al.*, 1999; Wolk *et al.*, 1999) o el diazoxide (Fedorov, 2011) describieron también una marcada heterogeneidad del periodo refractario tras la apertura de los canales en condiciones normóxicas que se tradujo en una mayor vulnerabilidad y facilidad para la inducción de arritmias en el corazón aislado de diferentes especies. Quintanilla *et al.*, (2013) volvieron a evidenciar este efecto utilizando técnicas de mapeo óptico de la actividad eléctrica en corazón aislado de cerdo y resaltaron que el demostrado carácter pro-arrítmico de la apertura de los canales en situación de normoxia podría extrapolarse al corazón humano dada la ausencia de diferencias electrofisiológicas importantes entre ambas especies (Stengel, 2010; citado por Quintanilla *et al.*, 2013).

Estos resultados apoyan la idea de que la apertura de los KATP puede tener efectos deletéreos que promuevan la arritmogénesis incluso en condiciones de normal perfusión. Trabajos ya clásicos dedicados al estudio de los mecanismos implicados en el desencadenamiento de la fibrilación ventricular (Moe *et al.*, 1941; Han y Moe, 1964) resaltaron la importancia de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio como

#### 4. Discusión

un factor fundamental en la aparición y perpetuación de las arritmias por reentrada (para revisión ver Jalife, 2000).

En lo que respecta a las posibles similitudes entre el grupo entrenado y el tratado con pinacidil, aunque en esta ocasión el estudio de la inducibilidad de la fibrilación no ha resultado estadísticamente significativo, sí que apreciamos una clara tendencia reflejada en el 44,44% de los casos del grupo tratado que entraron en fibrilación durante la aplicación del mencionado test. Pensamos que el acortamiento de la refractariedad inducida por el pinacidil, que hemos observado en el presente trabajo, junto a la mayor heterogeneidad electrofisiológica también referida por diferentes autores han sido los responsables de la mayor facilidad para inducir la fibrilación en el caso de los animales tratados con el abridor del canal KATP. Una vez más, el grupo tratado con pinacidil no se comporta electrofisiológicamente de manera similar al grupo entrenado. Las modificaciones que se producen en ambos grupos sobre las propiedades en las que se asienta la mayor o menor facilidad para el desencadenamiento de la fibrilación ventricular parecen seguir caminos opuestos.

##### **4.2.6 Respecto a la desfibrilación espontánea.**

En el estudio de las características del patrón fibrilatorio, y su evolución, durante el periodo de isquemia global hemos encontrado dos fenómenos importantes relacionados con la distinta modulación de los canales KATP. Por un lado, se ha evidenciado un claro efecto antiarrítmico derivado del bloqueo de los canales ATP-dependientes, como es la desfibrilación espontánea de todos los corazones tratados con glibenclamida (n=11). Este fenómeno, en el que se produce una

reversión de la arritmia (sin intervención externa) y el corazón recupera su ritmo sinusal fisiológico, ha sido descrito por otros autores con anterioridad (Vajda, 2007) y podría estar relacionado, al menos en parte, con la disminución de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio observada en estudios previos tras el bloqueo de la corriente que vehiculan estos canales (Parra *et al.*, 2012; del Canto *et al.*, 2012a). Farid *et al.*, (2011) realizaron un estudio electrocardiográfico en corazones humanos procedentes de pacientes con miocardiopatía y demostraron que la glibenclamida promovía la desfibrilación espontánea de los corazones en los primeros instantes de la FV, atenuando la heterogeneidad espacio-temporal de la refractariedad durante la fase prematura de la arritmia. La disminución de la energía requerida para la reversión de la fibrilación ventricular mediante la aplicación de choques eléctricos observada en trabajos precedentes (del Canto *et al.*, 2012b; Alves, 2015) también refuerza esta hipótesis ya que se ha descrito que la desfibrilación exitosa está relacionada con la capacidad de los choques eléctricos para sincronizar y disminuir la dispersión de los procesos de repolarización (Dillon, 1992; Dillon y Kwaku, 1998; Maharaj *et al.*, 2008).

#### **4.2.7 Respecto a la viabilidad eléctrica miocárdica.**

Otro fenómeno interesante derivado de la modulación los canales KATP, esta vez de la modulación positiva, lo hemos encontrado en el análisis de la incidencia de asistolia eléctrica durante la isquemia global. En todos los corazones tratados con pinacidil (n=9) se produjo una pérdida total de la actividad eléctrica dentro del tiempo de isquemia analizado, hecho que sólo de forma excepcional se ha podido constatar

#### 4. Discusión

en el resto de grupos experimentales. Se ha publicado que unos de los factores que pueden afectar significativamente a la supervivencia durante la instauración de una fibrilación ventricular de larga duración es el tiempo que transcurre hasta la completa depresión de la actividad eléctrica. Se ha estimado que el margen para una resucitación exitosa se limita a una ventana temporal de alrededor de diez minutos tras la parada cardiaca que conlleva la fibrilación ventricular (Roth *et al.*, 1984, citado por Taylor *et al.*, 2011). Nuestros resultados tras la administración de pinacidil parecen indicar que la apertura de los canales KATP durante la isquemia favorece el deterioro electrofisiológico impidiendo el mantenimiento de la actividad eléctrica y afectando a la viabilidad durante el desarrollo de la arritmia tras la abolición de la perfusión. Taylor *et al.*, (2011) investigando también la instauración de esta depresión eléctrica y asistolia durante la fibrilación ventricular de larga duración encontraron que, por el contrario, el tratamiento con glibenclamida además de prolongar la duración del potencial de acción y acortar los intervalos diastólicos contribuyó a disminuir el porcentaje de áreas de inexcitabilidad respecto al grupo de animales control. Es decir, el bloqueo del canal KATP exhibió un efecto protector que prolongó la viabilidad eléctrica durante la isquemia global. La progresiva pérdida de excitabilidad durante la isquemia miocárdica ha sido atribuida tradicionalmente al aumento de la concentración intersticial de potasio (Wilde *et al.*, 1990), que provocaría una disminución del potencial de reposo a voltajes menos negativos donde numerosos canales de Na<sup>+</sup> permanecerían en su estado inactivo (Shaw y Rudy, 1997). Esto provocaría una reducción de la amplitud y pendiente de ascenso de los potenciales de acción que generaría una menor corriente de propagación del impulso dificultando la transmisión

eléctrica, fenómeno que en última instancia, podría conducir al bloqueo completo de la conducción y a la asistolia eléctrica (Levick, 2010). El comportamiento opuesto que hemos observado en el grupo entrenado, donde únicamente se produjo la pérdida de la actividad eléctrica durante los 10 minutos de isquemia global en uno de los corazones, parece indicar que la adaptación al entrenamiento, al menos en lo que a este parámetro se refiere, no se encontraría mediada tampoco por una sobreexpresión y apertura de los canales K<sub>ATP</sub>.



---

## **5. CONCLUSIONES**





Hemos llevado a cabo esta investigación, comparando los efectos electrofisiológicos intrínsecos producidos por la realización de ejercicio físico crónico con aquellos derivados de la distinta modulación de los canales KATP, con el objetivo de contribuir a esclarecer la controversia existente en cuanto al papel que juegan estos canales en la cardio-protección mediada por el entrenamiento. Si bien encontramos en la literatura una mayoría de autores que argumentan que la protección cardiovascular estaría asociada, al menos en parte, a una sobreexpresión de los mismos, y correspondientemente, a un incremento de  $I_{KATP}$  durante la isquemia miocárdica, resultados obtenidos en trabajos precedentes realizados en nuestro grupo parecen apuntar en una dirección opuesta.

En esta ocasión, hemos analizado parámetros electrofisiológicos en ritmo sinusal, ritmo estimulado y durante la fibrilación ventricular inducida, relacionados con el automatismo cardiaco, la conducción auriculoventricular, la refractariedad y heterogeneidad intrínsecas, la viabilidad eléctrica y la arritmogénesis, tanto en circunstancias de normal oxigenación como bajo condiciones de isquemia global normotérmica. De los resultados obtenidos en nuestro modelo de isquemia global en corazón aislado de conejo podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Se reproducen resultados precedentes que confirman que el entrenamiento físico promueve modificaciones intrínsecas en el corazón como son: la depresión del cronotropismo sinusal y la conducción AV, el incremento de la refractariedad ventricular o la disminución de la heterogeneidad electrofisiológica que podrían contribuir, al menos en

## 5. Conclusiones

parte, a la protección que ejerce la realización de ejercicio físico crónico frente a la muerte súbita de origen cardiaco.

2. Las adaptaciones cardiacas derivadas del entrenamiento, que han sido clásicamente descritas y que se traducen en la depresión del cronotropismo sinusal y la conducción AV, no se encuentran mediadas en nuestro modelo, por la participación de los canales KATP.

3. En condiciones de normal oxigenación, el ejercicio físico crónico no parece actuar promoviendo la apertura del canal KATP en cuanto a refractariedad se refiere, si no, más bien al contrario, dados los resultados referentes a la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular inducida, los intervalos VV y el percentil 5 de los mismos, donde el grupo entrenado y el tratado con glibenclamida presentan valores similares que sugieren periodos refractarios mayores que los exhibidos en los grupos control y pinacidil.

4. En condiciones de normal oxigenación, el entrenamiento tampoco parece operar a través de la apertura del canal KATP, en lo que a heterogeneidad electrofisiológica se refiere, dado que la activación del mencionado canal con pinacidil, además de disminuir la refractariedad, incrementa significativamente la heterogeneidad electrofisiológica, creando en el miocardio ventricular un sustrato favorable para el desencadenamiento de arritmias por reentrada.

5. En condiciones de normal oxigenación, el sustrato arritmogénico favorecido tras la apertura del canal KATP se evidencia por la alta inducibilidad de la fibrilación ventricular durante los tests electro-

fisiológicos en ritmo estimulado, fenómeno que no se reproduce en los corazones de los conejos entrenados.

6. En el corazón de animal entrenado, sometido a isquemia global aguda se mantienen los parámetros de refractariedad durante la agresión isquémica reflejando una mejor preservación morfo-funcional del miocardio. El incremento de la citada propiedad durante el proceso isquémico en los grupos tratados, lo interpretamos como signo de deterioro del estatus metabólico del miocardio ventricular.

7. En el corazón de animal entrenado sometido a isquemia global aguda, la heterogeneidad electrofisiológica del corazón sigue un camino opuesto al corazón sometido a la apertura del canal KATP, y paralelo al sometido al bloqueo del mismo, observándose un incremento de la estabilidad y una disminución de la heterogeneidad electrofisiológica en las fases iniciales del proceso isquémico, que al menos en parte, podría contribuir en los casos observados de desfibrilación espontánea.

8. El ejercicio físico crónico tampoco parece actuar a través de la apertura del canal KATP, durante la isquemia global, dados los resultados referentes a la viabilidad eléctrica del miocardio, donde todos los corazones tratados con pinacidil entraron en asistolia eléctrica durante los primeros minutos de agresión isquémica, fenómeno que no se reprodujo en los corazones de los animales entrenados.

9. Comoquiera que los resultados correspondientes a los efectos del entrenamiento y los debidos a la apertura del canal KATP, no van en la misma dirección, sino más bien en sentidos opuestos, no parece que al

## 5. Conclusiones

menos a nivel electrofisiológico, la protección debida al ejercicio sea debida a una acción de apertura de los mencionados canales.

---

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Allen DG and Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res.* 60: 153-168, 1987.

Alves C. “Estudio comparativo de los efectos electrofisiológicos miocárdicos intrínsecos de la apertura del canal KATP y del ejercicio físico crónico, en situación de normoxia y tras isquemia regional aguda. Estudio experimental”. *Universitat de València-Estudi General*, 2015.

Ashcroft SJ and Ashcroft FM. Properties and functions of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Cellular Signalling*; 2: 197-214, 1990.

Åstrand PO, Rodahl K, Dahl HA and Stromme SB. Textbook of work physiology: Physiological bases of exercise (4<sup>th</sup>ed.) Illinois: *Human Kinetics*, 2003.

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

Becker V, Gonzalez-Serratos H, Alvarez R, Baermann M, Irls C and Ortega A. Effect of endurance exercise on the Ca<sup>2+</sup> pumps from transverse tubule and sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*; 97(2): 467-474, 2004.

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

Bersohn MM and Scheuer J. Effect of ischemia on the performance of hearts from physically trained rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 234: H215-H218, 1978.

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

## 6. Referencias bibliográficas

Billman GE. Role of the ATP sensitive potassium channel in extra-cellular potassium accumulation and cardiac arrhythmias during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res.* 28: 762-769, 1994.

Billman GE. Aerobic exercise conditioning: a non-pharmacological antiarrhythmic intervention. *Journal of Applied Physiology*; 92(2): 446-454, 2002.

Billman GE, Kukielka M, Kelley R, Moustafa-Bayoumi M and Altschuld RA. Endurance exercise training attenuates cardiac  $\beta_2$ -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 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. The cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel as a novel target for anti-arrhythmic therapy. *Pharmacol Ther.* 120(1): 54-70, 2008.

Bjornstad H, Storstein L, Meen HD and Hals O. Electrocardiographic findings of left, right and septal hypertrophy in athletic students and sedentary controls. *Cardiology*; 82(1): 56-65, 1993.

Bjornstad H, Storstein L, Meen HD and Hals O. Electrocardiographic findings of repolarization in athletic students and control subjects. *Cardiology*; 84(1): 51-60, 1994.

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

Bonaduce D, Petretta M, Cavallaro V, Apicella C, Ianniciello A, Romano M and Marciano F. Intensive training and cardiac autonomic



control in high level athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*; 30(5): 691-696, 1998.

Boraita PA and Serratos FL. "El corazón del deportista": hallazgos electrocardiográficos más frecuentes. *Revista Española de Cardiología*; 51(5): 356-368, 1998.

Bowles DK, Farrar RP and Starnes JW. Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 263: H804-H809, 1992.

Bowles DK and Starnes JW. Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *J Appl Physiol*. 76: 1608-1614, 1994.

Bramwell C and Ellis R. Clinical observations in olympic athletes. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*; 2: 51-60, 1929.

Brines L, Such-Miquel L, Gallego D, Trapero I, del Canto I, Zarzoso M, Soler C, Pelechano F, Cánoves J, Alberola A, Such L and Chorro FJ. Modifications of mechanoelectric feedback induces by 2,3- butanedione monoxime and Blebbistatin in Langendorff-perfused rabbit hearts. *Acta Physiol*. 206(1): 29-41, 2012.

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. *Cardiovascular Research*; 10(2): 160-168, 1976.

Brown MD. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp Physiol*. 88(5): 645-658, 2003.

Brugada J, Boersma L, Kirchhof C, Brugada P, Havenith M, Wellens HJ and Allessie M. Double wave reentry as a mechanism of

## 6. Referencias bibliográficas

acceleration of ventricular tachycardia. *Circulation*; 81(5): 1633-1643, 1990.

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

Carroll JF. Isolated heart responsiveness to beta-stimulation after exercise training in obesity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*; 35(4): 548-554, 2003.

Cha YM, Birgersdotter-Green U, Wolf PL, Peters BB and Chen PS. The mechanism of termination of reentrant activity in ventricular fibrillation. *Circ Res*. 74(3): 495-506, 1994.

Chen HI and Li HT. Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. *Arteriosclerosis and Thrombosis: Journal of Vascular Biology/American Heart Association*; 13(6): 852-856, 1993.

Chi L, Uprichard AC and Lucchesi BR. Profibrillatory actions of pinacidil in a conscious canine model of sudden coronary death. *J Cardiovasc Pharmacol*. 15(3): 452-64, 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, 2000a.

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, 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. *Pacing Clin Electrophysiol.* 23(11): 1594-1603, 2000c.

Chorro FJ, Guerrero J, Ferrero A, Tormos A, Mainar L, Millet J, Canoves J, Porres JC, Sanchis J, Lopez-Merino V and Such L. Effects of acute reduction of temperature on ventricular fibrillation activation patterns. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283(6): H2331-40, 2002.

Chorro FJ, Ferrero A, Canoves 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. *Pacing Clin Electrophysiol.* 26(5): 1262-1269, 2003.

Chorro FJ, Trapero I, Guerrero J, Such LM, Canoves 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, Guerrero J, Trapero I, Such-Miquel L, Mainar L, Canoves J, Blasco E, Ferrero A, Sanchis J, Bodí V and Such L. Time-frequency analysis of ventricular fibrillation. An experimental study. *Revista Española de Cardiología;* 59(9): 869-78, 2006.

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, 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.

## 6. Referencias bibliográficas

Chorro FJ, Pelechano F, Trapero I, Ibañez-Catalá X, Such-Miquel L, Tormos A, Guerrero J, Cánoves J, Mainar L, Millet J, Alberola and Such L. Modifications in ventricular fibrillation and capture capacity induced by a linear radiofrequency lesion. *Rev Esp Cardiol.* 65: 143-151, 2012.

Chorro FJ, Ibañez-Catalá X, Trapero I, Such-Miquel L, Pelechano F, Cánoves J, Mainar L, Tormos A, Cerdá JM, Alberola A and Such L. Ventricular fibrillation conduction through an isthmus of preserved myocardium between radiofrequency lesions. *Pacing Clin Electrophysiol.* 36: 286-298, 2013.

Collins HL, Loka AM and Di Carlo 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.

Cook DL and Hales CN. Intracellular ATP directly blocks  $K^+$  channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature*; 311: 271-3, 1984.

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  $IK_{ATP}$  blockade with glibenclamide on physiological heterogeneity of the ventricular myocardium. An experimental research. *Acta Physiologica*; 206(693): 206, 2012a.

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  $IK_{ATP}$  blockade on the energy to reverse ventricular fibrillation in the regional myocardial ischemia. An experimental study. *Eur Heart J.* 33(1055): 2012b.

Del Canto I, Such-Miquel L, Brines L, Soler C, Zarzoso M, Calvo C, Parra G, Tormos A, Alberola A, Millet J, Such L and Chorro FJ. Effects of JTV-519 on stretch-induced manifestations of mechano-electric feedback. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 43(11): 1062-1070, 2016.

Del Canto I, Santamaría L, Genovés P, Such-Miquel L, Arias-Mutis O, Zarzoso M, Soler C, Parra G, Tormos A, Alberola A, Such L and Chorro FJ. Effects of the inhibition of late sodium current by GS967 on stretch-induced changes in cardiac electrophysiology. *Cardiovasc Drug Ther.* 32(5): 413-425, 2018.

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. *British Journal of Sports Medicine*; 42(5): 386-388, 2008.

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

Dhamoon AS and Jalife J. The inward rectifier current ( $I_{K1}$ ) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*; 2(3): 316-324, 2005.

Di Carlo SE and Bishop VS. Exercise training enhances cardiac afferent inhibition of baroreflex function. *The American Journal of Physiology*; 258(1 Pt 2): H212-20, 1990.

Di Diego JM and Antzelevitch C. Pinacidil-induced electrical heterogeneity and extrasystolic activity in canine ventricular tissues. Does activation of ATP regulated potassium current promote phase 2 reentry? *Circulation*; 88(3): 1177-89, 1993.

Diffie GM, Seversen EA and Titus MM. Exercise training increases the  $Ca^{2+}$  sensitivity of tension in rat cardiac myocytes. *Journal of Applied Physiology*; 91(1): 309-315, 2001.

## 6. Referencias bibliográficas

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

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

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

Edmund CK and Qian L. Lactate Activates ATP-sensitive Potassium Channels in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *The Journal of Clinical Investigation*; 88: 1772-77, 1991.

Elrod JW, Harrell M, Flagg TP, Gundewar S, Magnuson MA, Nichols CG, Coetzee W and Lefer DJ. Role of Sulfonylurea Receptor Type 1 Subunits of ATP-Sensitive Potassium Channels in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*; 117: 1405-13, 2008.

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*; 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

Ferrero A, Chorro FJ, Cánoves J, Mainar L, Blasco E and Such L. Effect of flecainide on longitudinal and transverse conduction velocities in ventricular myocardium. An experimental study. *Rev Esp Cardiol.* 60(3): 315-8, 2007.

Fitzsimons DP, Bodell PW, Herrick RE and Baldwin KM. Left ventricular functional capacity in the endurance-trained rodent. *Journal of Applied Physiology;* 69(1): 305-312, 1990.

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.

Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R and Fleg J. Exercise standards for testing and training: A statement for healthcare professionals from the american heart association. *Circulation;* 104(14): 1694-1740, 2001.

Frommeyer G, Weller J, Ellermann C, Kaese S, Kochhäuser S, Lange PS, Dechering DG and Eckardt L. Antiarrhythmic properties of ivabradine in an experimental model of Short-QT Syndrome. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 44(9): 941-945, 2017.

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.

Garcia CR, Ruiz Granell R and Morell S. Arritmias: Concepto, mecanismos y aspectos generales. En Chorro FJ, García CR and López-Merino V. *Cardiología clínica.* Valencia, España: *PUV Publicacions;* 463-490, 2007.

## 6. Referencias bibliográficas

García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A and Ruiz-Meana M. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia–reperfusion. *Cardiovascular Research*; 61: 386-401, 2004.

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

Goldibi S and Laher I. Exercise and the Cardiovascular System. *Cardiology Research and Practice*; Article ID 210852, 2012.

Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL and Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *The Journal of Physiology*; 567(Pt 1): 113-120, 2005.

Griese M, Perlitz V, Jungling E and Kammermeier H. Myocardial performance and free energy of ATP-hydrolysis in isolated rat hearts during graded hypoxia, reoxygenation and high  $K_e^+$ -perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 20(12): 1189-1201, 1988.

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

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

Gwathmey JK, Slawsky MT, Perreault CL, Briggs GM, Morgan JP and Wei JY. Effect of exercise conditioning on excitation-contraction coupling in aged rats. *Journal of Applied Physiology*; 69(4): 1366-71, 1990.

Hajnal A, Nagy O, Litvai A, Papp J, Parratt JR y Vegh A. Nitric oxide involvement in the delayed antiarrhythmic effect of treadmill exercise in dogs. *Life Sciences*; 77(16): 1960-1971, 2005.



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

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

Harris AS. Potassium and experimental coronary occlusion. *Am Heart J*. 71: 797-802, 1966.

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.

Hepp A, Hansis M, Gulch R and Jacob R. Left ventricular isovolumetric pressure-volume relations, "diastolic tone", and contractility in the rat heart after physical training. *Basic Research in Cardiology*; 69(5): 516-532, 1974.

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

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I and Kurachi Y. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol Rev*. 90: 291-366, 2010.

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.

Jalife J. Ventricular fibrillation: Mechanisms of initiation and maintenance. *Annual Review of Physiology*; 62: 25-50, 2000.

## 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.

Janse MJ and Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiological Reviews*; 69(4): 1049-1149, 1989.

Jew KN, Olsson MC, Mokolke EA, Palmer BM and Moore RL. Endurance training alters outward K<sup>+</sup> current characteristics in rat cardiocytes. *Journal of Applied Physiology*; 90(4): 1327-1333, 2001.

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, 2002.

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.

Jin H, Insuk S, Eui-Yong K and Yung EE. ATP-sensitive potassium channels are modulated by intracellular lactate in rabbit ventricular myocytes. *Pflügers Arch*. 425: 546-548, 1993.

Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM and Ogasawara AK. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *American Journal of Physiology; Heart and Circulatory Physiology*; 279(6): H2994-3002, 2000.

Jover B, McGrath BP and Ludbrook J. Haemodynamic and metabolic responses of laboratory rabbits to near-maximal treadmill exercise. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*; 14(12): 811-823, 1987.

Katona PG, McLean M, Dighton DH and Guz A. Sympathetic and parasympathetic cardiac control in athletes and nonathletes at rest.

*Journal of Applied Physiology; Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*; 52(6): 1652-1657, 1982.

Kirkels J, Van Echteld C and Ruigrok T. Intracellular magnesium during myocardial ischemia and reperfusion: possible consequences for postischemic recovery. *J Moll Cell Cardiol.* 21: 1209-18, 1989.

Kléber AG. Extracellular potassium accumulation in acute myocardial ischemia. *J Moll Cell Cardiol.* 16: 389-394, 1984.

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

Kohl P, Hunter P and Noble D. Stretch-induced changes in heart rate and rhythm: Clinical observations, experiments and mathematical models. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*; 71(1): 91-138, 1999.

Koninckx, M. “Estudio de la posible participación de la corriente IKATP en las modificaciones que sobre estabilidad y heterogeneidad miocárdica produce el ejercicio físico crónico, en corazón aislado, normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda”. *Universitat de València-Estudi General*, 2014.

Lamb DR. Fisiología del Ejercicio. Respuestas y adaptaciones (2ª Ed). Madrid: Pila Teleña. 1989.

Laughlin MH, Bowles DK and 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.

## 6. Referencias bibliográficas

Levick JR. An introduction to cardiovascular physiology (5<sup>th</sup> ed). Boca Raton, Florida: CRC Press, 2010.

Levine BD, Lane LD, Buckey JC, Friedman DB and Blomqvist CG. Left ventricular pressure-volume and frank-Starling relations in endurance athletes: implications for orthostatic tolerance and exercise performance. *Circulation*; 84(3): 1016-1023, 1991.

Levy WC, Cerqueira MD, Harp GD, Johannessen KA, Abrass IB, Schwartz RS and Stratton JR. Effect of endurance exercise training on heart rate variability at rest in healthy young and older men. *The American Journal of Cardiology*; 82(10): 1236-1241, 1998.

Lewis SF, Nylander E, Gad P and Areskog NH. Non-autonomic component in bradycardia of endurance trained men at rest and during exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*; 109(3): 297-305, 1980.

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

Lujan, HL, Britton SL, Koch LG, and Di Carlo 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, Brown DA, Jew KN, Lynch JM, Glunt JM, Parsons TA, Cheung JY and Moore RL. Influence of age and run training on cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 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.

Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Valles S, Soler C and Mauricio MD. Chronic exercise impairs nitric oxide pathway in rabbit carotid and femoral arteries. *J Physiol.* 596(18): 4361-4374, 2018.

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

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

Meng H and Pierce GN. Metabolic and physiological response of the rabbit to continuous and intermittent treadmill exercise. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 68(7): 856-862, 1990.

Mines GR. On circulating excitations in heart muscles and their possible relation to tachycardia and fibrillation. *Trans R Soc Can IV.* 43-52, 1914.

Mitchell JH, Haskell W, Snell P and Van Camp SP. Task force 8: Classification of sports. *Journal of the American College of Cardiology*; 45(8): 1364-1367, 2005.

Moe GK, Harris AS and Wiggers CJ. Analysis of the initiation of fibrillation by electrographic studies. *American Journal of Physiology* 134(3): 473-492, 1941.

Moe GK and Abildskov JA. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *American Heart Journal*; 58(1): 59-70, 1959.

Mokelke EA, Palmer BM, Cheung JY and Moore RL. Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat

## 6. Referencias bibliográficas

myocardium. *The American Journal of Physiology*; 273(3): H1193-7, 1997.

Molé PA. Increased contractile potential of papillary muscles from exercise trained rat hearts. *The American Journal of Physiology*; 234(4): H421-5, 1978.

Moore RL, Musch TI, Yelamarty RV, Scaduto RC Jr, Semanchick AM, Elensky M and Cheung JY. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *The American Journal of Physiology*; 264(5 Pt 1): C1180-9, 1993.

Mountcastle VB. Fisiología médica. Vol II. Saint Louis: *The CV Mosby Company*, 1974.

Nakaya H. Role of ATP-Sensitive K<sup>+</sup> 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. *The Journal of Physiology*; 541(Pt 3): 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, Singh GK and Grange DK. KATP Channels and Cardiovascular Disease: Suddenly a Syndrome. *Circ Res*. 112: 1059-1072, 2013.

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

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

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

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

Panfilov AV. Is heart size a factor in ventricular fibrillation? Or how close are rabbit and human hearts?. *Heart Rhythm*. 3(7): 862-4, 2006.

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”. *Universitat de Valencia-Estudi General*, 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. An experimental study. *Acta Physiologica*; 206 (Suppl693): 196, 2012.

Pelechano F, Such-Miquel L, Such L, López L, Salvador RE, Chorro FJ, Trapero I, Cebriá A, Gómez P and Alberola AM. 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”. *Universitat de Valencia-Estudi General*, 2008.

## 6. Referencias bibliográficas

Pelliccia A, Maron BJ, Spataro A, Proschan MA and Spirito P. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *The New England Journal of Medicine*; 324(5): 295-301, 1991.

Piper HM, Knoll T and Siegmund B. Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell. *Cardiovascular Research*; 28: 1-15, 1994.

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

Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A and van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*; 101(3): 336-344, 2000.

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.

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 cardio-protection against apoptosis. *J Appl Physiol*. 113(3): 498-506, 2012.

Quintanilla JG, Moreno J, Archondo T, Chin A, Pérez-Castellano N, Usandizaga E, García-Torrent MJ, Molina-Morúa R, González P, Rodríguez-Bobada C, Macaya C and Pérez-Villacastín J. KATP channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res*. 99(3): 576-85, 2013.

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



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

Riascos D, Baltaxe E and Pascual G. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido. *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 di Sanita;* 37(3): 351-359, 2001.

Schaible TF and Scheuer J. Cardiac adaptations to chronic exercise. *Progress in Cardiovascular Diseases;* 27(5): 297-324, 1985.

Segal SS. Fisiología del ejercicio y ciencias del deporte . Boron W and Boulpaep E. Fisiología Médica. 3ª ed. *Elsevier;* Barcelona, 1204-1222, 2017.

Shaw RM and Rudy Y. Electrophysiologic Effects of Acute Myocardial Ischemia. A Mechanistic Investigation of Action Potential Conduction and Conduction Failure. *Circulation Research;* 80: 124-138, 1997.

Skinner JS, Gaskill SE, Rankinen T, Leon AS, Rao DC, Wilmore JH, and Bouchard C. Heart rate versus %VO<sub>2</sub>max: Age, sex, race, initial fitness, and training response. *Medicine and Science in Sports and Exercise;* 35(11): 1908-1913, 2003.

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

## 6. Referencias bibliográficas

Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research*; 42(2): 377-390, 1999.

Soler C, Such-Miquel L, Brines L, Del Canto I, Gallego N, Parra G, Guerrero J, Zarzoso M, Koninckx M and Such-Belenguer L. Physical training and *IK*ATP blockade maintain myocardial conduction velocity after acute coronary occlusion in isolated rabbit heart. *Eur Heart J*. 35 (suppl 1): P1426: 733, 2014.

Spirito P, Pelliccia A, Proschan MA, Granata M, Spataro A and Bellone P. Morphology of the "athlete's heart" assessed by echocardiography in 947 elite athletes representing 27 sports. *The American Journal of Cardiology*; 74(8): 802-806, 1994.

Spruce AE, Standen NB and Stanfield PR. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature*; 31: 736-8, 1985.

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y and Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science*; 245: 177-80, 1989.

Stein R, Medeiros CM, Rosito GA, Zimmerman LI and Ribeiro JP. Intrinsic sinus and atrioventricular node electrophysiologic adaptations in endurance athletes. *Journal of the American College of Cardiology*; 39(6): 1033-1038, 2002.

Stengl M. Experimental models of spontaneous ventricular arrhythmias and of sudden cardiac death. *Physiol Res*. 59 (Suppl 1): S25-3, 2010.

Stoller D, Kakkar R, Smelley M, Chalupsky K, Earley JU, Shi N, Makielski JC and McNally EM. Mice lacking sulfonyleurea receptor 2 (SUR2) ATP-sensitive potassium channels are resistant to acute cardiovascular stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 43: 445-454, 2007

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.

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.

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 L, Alberola A, Orts L, Such-Miquel L, Pelechano F, Trapero I 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: 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.

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. A study in isolated rabbit heart. *Eur Heart J.* 28(Suppl1): 523, 2007.

Such-Miquel L, Del Canto I, Zarzoso M, Brines L, Soler C, Parra G, Guill A, Alberola AM, Such L and Chorro FJ. Effects of S-nitrosoglutathione on electrophysiological manifestations of mechanoelectric feedback. *Cardiovasc Toxicol.* 18(6): 520-529, 2018a.

## 6. Referencias bibliográficas

Such-Miquel L, Brines L, Alberola AM, Zarzoso M, Chorro FJ, Guerrero J, Parra G, Gallego N, Soler C, Del Canto I, Guill A and Such L. Effect of chronic exercise on myocardial electrophysiological heterogeneity and stability. Role of intrinsic cholinergic neurons: A study in the isolated rabbit heart. *Plos one*; in press, 2018b.

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

Talan DA, Bauernfeind RA, Ashley WW, Kanakis CJ and Rosen KM. Twenty-four hour continuous ECG recordings in long-distance runners. *Chest*; 82(1):19-24, 1982.

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.

Taylor TG, Venable PW, Shibayama J, Warren M and Zaitsev AV. Role of KATP channel in electrical depression and asystole during long-duration ventricular fibrillation in ex vivo canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 302(11): H2396-409, 2012.

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

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

Uchida L, Yashima M, Gotoh M, Qu Z, Garfinkel, A, Weiss JN, Fishbein MC, Mandel WJ, Chen PS and Karagueuzian HS. Mechanism of Acceleration of Functional Reentry in the Ventricle. Effects of ATP-Sensitive Potassium Channel Opener. *Circulation*; 99: 704-712, 1999;

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

Viitasalo MT, Kala R and Eisalo A. Ambulatory electrocardiographic finding in young athletes between 14 and 16 years of age. *European Heart Journal*; 5(1): 2-6, 1984.

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

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. *Circulation Research*; 67: 835-845, 1990

Wilmore JH, Stanforth PR, Gagnon J, Rice T, Mandel S, Leon AS and Bouchard C. Heart rate and blood pressure changes with endurance training: The HERITAGE family study. *Medicine and Science in Sports and Exercise*; 33(1): 107-116, 2001.

Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G and Ellingsen O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovascular Research*; 50(3): 495-508, 2001.

## 6. Referencias bibliográficas

Wolk R, Cobbe SM, Kane KA and Hicks MN. Relevance of inter and intraventricular electrical dispersion to arrhythmogenesis in normal and ischaemic rabbit myocardium: a study with cromakalim, 5-hydroxydecanoate and glibenclamide. *J Cardiovasc Pharmacol.* 33: 323-334, 1999.

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.

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.

Yan GX, Yamada KA, Kleber AG, Mc Howat J and Corr PB. Dissociation between cellular K<sup>+</sup> loss, in repolarisation time, and tissue ATP levels during myocardial hypoxia an ischemia. *Circ Res.* 72: 560-570, 1993.

Yang Z, Zhang H, Kong S, Yue XF, Jin YB, Jin J and Huang YC. Study for relevance of the acute myocardial ischemia to arrhythmia by the optical mapping method. *Physiol Meas.* 28(5): 481-8, 2007.

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.

Zaitsev AV, Guha PK, Sarmast F, Kolli A, Berenfeld O, Pertsov AM and Jalife J. Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circulation Research*; 92(5): 546-553, 2003.

Zarzoso, M. "Modificaciones del automatismo, conducción, refractariedad miocárdicas y del patrón fibrilatorio ventricular

producidas por el ejercicio físico crónico: influencia del sistema nervioso cardíaco”. *Universitat de València-Estaudi General*, 2011.

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

Zimmer HG. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol. Sci*. 13: 203-210, 1998.

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(20): 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(1): 72-81, 2011.

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