

EFFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS INTRÍNSECOS DEL EJERCICIO FÍSICO CRÓNICO SOBRE EL MIOCARDIO VENTRICULAR NORMÓXICO Y TRAS ISQUEMIA REGIONAL AGUDA: IMPLICACIÓN DEL CANAL  $K_{ATP}$ . ESTUDIO EN CORAZÓN AISLADO DE CONEJO.

**Tesis doctoral**



Facultat de Medicina i Odontologia  
Programa de Doctorado en Fisiología



**PRESENTADA POR:**  
Ft. Nathalia Gallego Rojas

**DIRECTORES:**

Dr. Luis Such Belenguer

Dr. Juan F. Guerrero Martínez

Dr. Germán Parra Giraldo



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Julio 2021



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

 **Facultat de Medicina i Odontologia**

**Departamento de Fisiología**

**Programa de Doctorado en Fisiología**

**“EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS INTRÍNSECOS DEL EJERCICIO FÍSICO CRÓNICO SOBRE EL MIOCARDIO VENTRICULAR NORMÓXICO Y TRAS ISQUEMIA REGIONAL AGUDA: IMPLICACIÓN DEL CANAL  $K_{ATP}$ . ESTUDIO EN CORAZÓN AISLADO DE CONEJO”**

**TESIS DOCTORAL**

**PRESENTADA POR:**

**Ft. Nathalia Gallego Rojas**

**DIRECTORES:**

**Dr. Luis Such Belenguer**

**Dr. Juan F. Guerrero Martínez**

**Dr. Germán Parra Giraldo**

**VALENCIA**

**Julio, 2021**



El **Dr. D. Luis Such Belenguer**, profesor emérito del Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València, el **Dr. D. Juan F. Guerrero Martínez**, Catedrático del Departamento de Ingeniería Electrónica. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Electrónica, Facultad de Física. Universitat de València. y el **Dr. D. Germán Parra Giraldo**, Profesor Asociado del Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València,

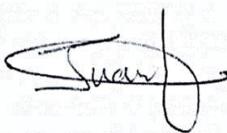
**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria, titulada “*Efectos Electrofisiológicos Intrínsecos del Ejercicio Físico Crónico Sobre el Miocardio Ventricular Normóxico y tras Isquemia Regional Aguda: Implicación del Canal  $K_{ATP}$ . Estudio en Corazón Aislado de Conejo*”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por **Dña. Nathalia Gallego Rojas**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 19 de enero de 2021.



Fdo.: Luis Such Belenguer.  
Director



Fdo.: Juan F. Guerrero Martínez.  
Director



Fdo.: Germán Parra Giraldo.  
Director



La presente tesis doctoral fue realizada gracias a la financiación del proyecto de investigación titulado “*Efectos del entrenamiento sobre las modificaciones que la isquemia miocárdica produce en parámetros electrofisiológicos arritmogénicos. Implicación de la corriente  $I_{K_{ATP}}$* ”, con referencia DEP2010-22318-C02-01, por parte del antiguo Ministerio de Ciencia e Innovación; y cuyo investigador principal es el Dr. D. Luis Such Belenguer. También ha ayudado en la financiación la subvención otorgada por la Generalitat Valenciana mediante el programa PROMETEO 2010/093.





## AGRADECIMIENTOS

Hoy que por fin culmino esta etapa tan importante de mi vida, quiero dar primero las gracias a Dios porque me ha dado las fuerzas para seguir en el camino y no abandonar, y por poner en mi vida a personas tan maravillosas que de una u otra forma también me acompañaron, me ayudaron y nunca me dejaron sola en este largo proceso.

Entre esas personas tan especiales le agradezco profundamente a mis directores de tesis: Luis, Juan F. y Germán. Sé que sin vuestra invaluable ayuda, vuestro apoyo, permanente disposición y esfuerzo, esta tesis no hubiese sido posible. Luis, gracias por acogerme en tu grupo de investigación y por haberme enseñado con tanto ahínco y perseverancia. Un gran aprendizaje que me llevo es que siempre se pueden hacer las cosas mejor si se pone empeño y se trabaja en ello. Gracias por tu entrega permanente, tu dedicación y tu apoyo durante todo este tiempo, pues fue sin duda la base para poder alcanzar esta meta. Juan F., gracias porque fue por ti que logré entender cómo una “simple” bioseñal podría almacenar una gran cantidad de información y que, como en el caso de esta tesis, fue totalmente relevante para comprender la información que podría aportar la señal fibrilatoria. Gracias también porque siempre te mostraste amable y dispuesto a ayudarme en todo lo que fuese necesario. Germán, a ti te agradezco por el apoyo que me has dado, por los consejos, por la ayuda y el acompañamiento constante. Tú, sin duda alguna, también fuiste partícipe de que yo no tirara la toalla y me rindiera antes de tiempo, y eso tiene un gran valor para mí.

Al resto de miembros del Grupo de Investigación en Electrofisiología Cardíaca y Bioingeniería: Javier, gracias porque con tu ejemplo constante como persona y como investigador has dejado una gran enseñanza en mí. A Antonio gracias por tu

paciencia, tus consejos, tu ayuda y por supuesto por alegrarnos con tus bromas y tu sentido del humor. A Luis Jr., gracias por tus enseñanzas, por las charlas compartidas, por tu profunda sinceridad, por tu trato, por tu respeto hacia mí y, por supuesto, gracias por siempre “acordarte” de mis cumpleaños. A Laia gracias por recibirme con tanto cariño, a Manolo gracias por tus consejos y tus enseñanzas. A Irene, Carlos, Catia y Manu gracias por los momentos compartidos y por toda vuestra ayuda para la realización de esta tesis.

Al equipo de la UCIM y al personal técnico de laboratorio, les agradezco por todo el trabajo realizado tanto en el cuidado y mantenimiento de los conejos, como en el acompañamiento durante las preparaciones experimentales. Su aporte para el desarrollo de esta tesis fue realmente valioso.

A la directora del Doctorado (M<sup>a</sup> Rosario) y a la secretaria del Departamento de Fisiología (Mari) les agradezco infinitamente porque siempre estuvieron dispuestas a ayudarme y a orientarme en todo lo que durante este tiempo necesité.

De otro lado, y no menos importante, el transitar por este largo camino, que para mí no ha sido nada fácil, ha hecho que cada día me reafirme más en agradecerle a Dios por los padres que me dio. Tengo la clara certeza que sin ellos, alcanzar esta meta hubiese sido casi imposible. Papi, gracias porque sé que siempre hiciste tu mayor esfuerzo por cuidarnos y por dar a nuestra familia lo mejor. Gracias por motivarme con tu ejemplo a seguir mis sueños y a creer que, si uno persiste consigue todo lo que se propone. Gracias porque también siempre me has apoyado en todos los caminos que he tomado, aunque a veces no estuvieras de acuerdo, y porque a pesar de la distancia siempre estás ahí para mí. A mi Mami, el pilar fundamental de mi vida, le agradezco infinitamente su amor, su cariño, su paciencia y su entrega total. Ojalá todos tuvieran la dicha de tener una madre como la mía, que me da fuerzas, me anima, me abraza y me calma cuando estoy en medio de la tempestad. Gracias

Mami porque gran parte de lo que soy y de lo que he logrado te lo debo a ti y a todo tu esfuerzo. ¡Gracias porque a pesar de la distancia nunca me has dejado sola en mis batallas y no tengo cómo más demostrarte lo importante que has sido y eres en mi vida!

A mi tía Mary, que más que mi tía ha sido mi segunda mamá. Gracias por siempre haber estado conmigo en las buenas y en las malas desde que nací. Gracias por escucharme, por ayudarme, por defenderme y por cuidarme siempre con tanto amor. Sé que también estás muy feliz de que yo haya llegado por fin aquí.

A mi hermana, gracias por apoyarme y aconsejarme cuando lo he necesitado. Y gracias por siempre preocuparte por mí y por celebrar también con mis alegrías y mis triunfos.

A mi esposo, gracias por estar en mi vida. Gracias por recordarme constantemente lo importante que era lograr esta meta. Gracias por tu apoyo para que yo pudiera seguir estudiando y pudiera perseguir mis sueños. Y sobre todo gracias por entender mis ausencias...

A mi familia, en especial a mis abuelos, a mis tíos (Armando y Edinson) y a Maria Teresa, gracias les doy por sus sentidas oraciones, pues sin la intervención de Dios y la Virgen María esto no hubiese sido posible. También gracias a Pipe, ya que con su ayuda la portada de esta tesis luce más bonita.

A mis profesores de la Universidad del Valle, y en especial a la Dra. Mercedes Salcedo Cifuentes de quién aprendí tanto y fue quién me contagió su entusiasmo por la investigación. A mis profesoras Diana Perafán, Marcela Bolaños y Esther Wilches Luna: aunque los comienzos no fueron fáciles, no puedo estarles más agradecida a ustedes por todo lo que hicieron por mí cuando más las necesite. Nunca las he

olvidado. Al profesor Jose Óscar Gutiérrez y al Dr. Leonardo Fierro gracias por aceptarme durante mi estancia doctoral en su Grupo de Investigación Farmacología Univalle. Aunque fue corto el tiempo compartido, fue realmente valioso todo el aprendizaje que obtuve con ustedes.

A mis profesores y compañeros del FP en Laboratorio Clínico y Biomédico, y en especial a Erik, Kathy, Dayana, Susana y Victoria; gracias porque con el tiempo compartido estos casi dos años, me han devuelto gran parte de la alegría y de las ganas de aprender. Aunque no se lo imaginen o no lo entiendan, ustedes han sido como una bala de oxígeno para mí. Un agradecimiento especial quiero dar a Tamara, por su desinteresada ayuda, y a Violeta, por su férrea implicación por ayudarme. Mi agradecimiento es con todo el corazón.

Y finalmente, no puedo olvidarme de mis queridas amigas Paola, Katherine y María Isabel porque fueron ustedes quienes más creyeron en mí cuando ni yo misma lo hacía. Gracias a su apoyo logré terminar mi carrera de fisioterapia, y eso ha sido determinante para que hoy yo pueda estar aquí. Gracias a mis amigas Melisa, Vero R., Rosa, Ana y Vero F., porque me han animado desde la distancia. A Gaby, Chichita, Cinthya, Aleja, Paulina y Margus... ustedes más que amigas han sido como mis hermanas aquí. Gracias por estar conmigo siempre y por sentir mis alegrías y mis triunfos como propios. ¡Las quiero!

Y por supuesto, no puedo olvidarme de agradecer con el alma a todos los conejitos que fueron partícipes de esta investigación. Sus vidas tuvieron un sentido enorme para mí, pues creo que con esta tesis ayudaremos a salvar vidas.



Dedicada a mis padres,  
y a mi Mirris.

Yo creo en muchas cosas que no he visto.  
Y ustedes también,  
¡lo sé!  
No se puede negar la existencia de algo palpado,  
por más etéreo que sea.  
¡No hace falta exhibir una prueba de decencia,  
de aquello que es tan verdadero!  
El único gesto es creer,  
o no...  
Algunas veces,  
hasta creer llorando.

Se trata de un tema incompleto porque le falta respuesta.  
Respuesta,  
que alguno de ustedes,  
quizás,  
le pueda dar...

Willie Colón





# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
1.1.1. Objetivo general .....	15
1.1.2. Objetivos específicos .....	16
<b>1.2. JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS (ANTECEDENTES) .....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Consideraciones fundamentales sobre la electrofisiología cardiaca normal .....	18
1.2.2. Alteraciones miocárdicas producidas por la isquemia aguda .....	30
1.2.2.1. Generalidades .....	30
1.2.2.2. Estudio especial de las modificaciones electrofisiológicas por la isquemia .....	39
1.2.3. El ejercicio físico crónico como maniobra antiarrítmica no farmacológica .....	43
1.2.3.1. Efectos del entrenamiento físico sobre las propiedades eléctricas del corazón .....	47
1.2.3.2. Las modificaciones electrofisiológicas miocárdicas por el ejercicio físico crónico como mecanismo básico protector antiarrítmico .....	50
1.2.4. Implicación del canal $K_{ATP}$ en la fisiopatología de la isquemia miocárdica .....	52

1.2.4.1. Generalidades del canal de potasio ATP-dependiente .	52
1.2.4.2. Importancia de los canales de $K_{ATP}$ a nivel cardíaco..	55
1.2.4.3. Comportamiento del canal $K_{ATP}$ en la isquemia miocárdica ..	57
1.2.5. Efectos de la activación y bloqueo de los canales $K_{ATP}$ en la isquemia miocárdica. Efectos específicos de las actuaciones sobre el canal $K_{ATP}$ del sarcolema frente al canal $K_{ATP}$ mitocondrial ..	60
1.2.6. Papel de los canales $K_{ATP}$ como posible mecanismo por el que el ejercicio físico ejerce su efecto protector antiarrítmico ..	67
1.2.6.1. ¿Bloquea el ejercicio físico crónico los canales $K_{ATP}$ , en el miocardio isquémico? Investigaciones que apoyan este mecanismo ..	68
1.2.6.2. ¿Abre el ejercicio físico crónico los canales $K_{ATP}$ , en el miocardio isquémico? Investigaciones que apoyan este mecanismo ..	69
<b>1.3. RESUMEN DE LA JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO ..</b>	<b>71</b>
<b>1.4. PLAN DE TRABAJO ..</b>	<b>72</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS ..</b>	<b>75</b>
<b>2.1. MATERIALES ..</b>	<b>75</b>
2.1.1. Animales de experimentación.....	75
2.1.1.1. Modelo animal empleado ..	75
2.1.2. Reactivos, fármacos y otros compuestos.....	77
2.1.2.1. Para la fase de heparinización y anestesia del animal ..	77
2.1.2.2. Para la fase de perfusión.....	77
2.1.3. Fungibles.....	78

2.1.4.	Equipos .....	79
2.1.4.1.	Equipamiento para la preparación de soluciones...	79
2.1.4.2.	Equipamiento para el protocolo de entrenamiento .. .....	80
2.1.4.3.	Equipamiento para el aislamiento del corazón .....	81
2.1.4.4.	Equipamiento para estudio electrofisiológico: Sistema de Langendorff.....	83
2.1.4.5.	Equipamiento para revertir la fibrilación .....	93
2.1.5.	Hardware y software empleado.....	94

## **2.2. MÉTODOS .....**

2.2.1.	Protocolo de mantenimiento de los conejos .....	96
2.2.2.	Protocolo de supervisión de los animales.....	97
2.2.3.	Protocolo de clasificación de los animales empleados en el estudio .....	98
2.2.4.	Protocolo de entrenamiento físico.....	99
2.2.5.	Medidas correctoras previstas en caso de sufrimiento animal ..	101
2.2.6.	Preparación experimental.....	102
2.2.7.	Protocolo experimental .....	105
2.2.8.	Protocolo para revertir la fibrilación ventricular .....	108
2.2.9.	Protocolo de marcaje de los registros electrográficos.....	109
2.2.10.	Parámetros electrofisiológicos: definiciones y determinación de los mismos .....	111
2.2.10.1.	Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración del cronotropismo.....	112
2.2.10.2.	Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la refractariedad miocárdica .....	112
2.2.10.3.	Parámetros electrofisiológicos para el análisis de la frecuencia de la fibrilación ventricular (FV) .....	114

2.2.10.4. Parámetro utilizado para analizar la regularidad de la señal fibrilatoria .....	115
2.2.10.5. Parámetros utilizados para la valoración de la energía mínima necesaria para revertir la FV.....	115
2.2.10.6. Parámetros utilizados para la valoración de la estabilidad electrofisiológica del corazón que ha fibrilado...	115
<b>2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>116</b>
<b>2.4. LEGISLACIÓN.....</b>	<b>117</b>
<b>2.5. FINANCIACIÓN .....</b>	<b>117</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>121</b>
<b>3.1. REFRACTARIEDAD DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR .....</b>	<b>121</b>
3.1.1. Periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular (PRFFV) .....	121
3.1.2. Frecuencia dominante de la FV .....	122
<b>3.2. ENERGÍA NORMALIZADA .....</b>	<b>124</b>
<b>3.3. UMBRAL DE DESFIBRILACIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE CHOQUES ELÉCTRICOS .....</b>	<b>125</b>
<b>3.4. OTROS RESULTADOS DE INTERÉS .....</b>	<b>126</b>
3.4.1. Respecto al cronotropismo sinusal.....	127
3.4.2. Desfibrilaciones espontáneas.....	128
3.4.3. Recidivas espontáneas.....	129
3.4.4. Peso corporal del conejo, peso de su corazón y flujo coronario	131
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>137</b>

<b>4.1. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LOS MATERIALES Y MÉTODOS EMPLEADOS .....</b>	<b>138</b>
4.1.1. Respecto a la idoneidad de la especie seleccionada.....	138
4.1.2. Respecto al sistema de perfusión tipo Langendorff .....	140
4.1.3. Respecto a la metodología para la determinación de los parámetros electrofisiológicos .....	143
<b>4.2. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y SU SIGNIFICADO .....</b>	<b>145</b>
4.2.1. respecto al periodo refractario funcional previamente a la oclusión arterial coronaria y tras la oclusión.....	145
4.2.2. Respecto a la FD de la FV previamente a la OAC.....	148
4.2.3. Respecto a la FD de la FV tras la OAC .....	149
4.2.4. Respecto a la energía normalizada de la señal fibrilatoria.....	152
4.2.5. Respecto a la energía mínima necesaria para interrumpir el proceso fibrilatorio en el miocardio isquémico .....	153
4.2.6. Respecto al cronotropismo sinusal.....	158
4.2.7. Respecto al desarrollo de desfibrilaciones espontáneas .....	159
4.2.8. Respecto a la recurrencia de eventos fibrilatorios ventriculares tras la desfibrilación.....	159
<b>4.3. CONSIDERACIONES FINALES RESPECTO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....</b>	<b>160</b>
<b>4.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....</b>	<b>161</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>167</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>171</b>



## ABREVIATURAS

**ATP:** adenosina trifosfato intracelular.

**DDE:** despolarización diastólica espontánea

**DMSO:** dimetil sulfóxido.

**DPA:** duración del potencial de acción.

**E<sub>Na</sub>:** potencial de equilibrio para el sodio.

**FD:** frecuencia dominante.

**FDM:** frecuencia dominante media.

**FDM<sub>Max</sub>:** frecuencia dominante máxima.

**FDM<sub>Min</sub>:** frecuencia dominante mínima.

**HSP:** proteínas de choque térmico.

**I<sub>b</sub>:** corriente de entrada (inespecífica).

**I<sub>CaL</sub>:** corriente de entrada de calcio de larga duración.

**I<sub>CaT</sub>:** corriente de entrada de calcio transitoria.

**I<sub>r</sub>:** corriente de entrada (marcapasos).

**I<sub>K</sub>:** corriente de potasio rectificadora retardada.

**I<sub>K1</sub> o I<sub>KIR</sub>:** corriente de rectificación interna de potasio.

**I<sub>KAA</sub>:** corriente de potasio rectificadora externa.

**I<sub>KACH</sub>:** corriente de potasio activada por acetilcolina

**I<sub>KATP</sub>:** corriente de potasio ATP dependiente.

**I<sub>KNa</sub>:** corriente de potasio activada por sodio.

**I<sub>Kur</sub>:** corriente de potasio de rectificación tardía ultra-rápida.

**I<sub>Na</sub>:** corriente de entrada rápida de sodio.

**Inos:** óxido-nítrico-sintasa.

**IR:** isquemia-reperfusión.

**I<sub>us</sub> o I<sub>late</sub>:** corriente repolarizante de potasio de inactivación lenta.

**I<sub>to</sub>:** corriente transitoria de salida de potasio.

**K<sub>ATP</sub>**: canal de potasio ATP dependiente.

**KCOs**: abridores de los canales de potasio.

**K<sub>ir</sub>**: canal de potasio de rectificación interna.

**K<sub>ir6.2</sub>**: subunidades de canal de potasio rectificador interno.

**K<sub>r</sub>**: canal rectificador retardado rápido de potasio.

**K<sub>s</sub>**: canal rectificador retardado lento de potasio.

**mitoK<sub>ATP</sub>**: canal de potasio ATP dependiente mitocondrial.

**MnSOD**: superóxido dismutasa de manganeso.

**P5**: percentil 5.

**PRA**: El periodo refractario absoluto.

**PCI**: preconditionamiento isquémico.

**PMR**: potencial de membrana en reposo.

**PRE**: periodo refractario efectivo.

**PRFFV**: periodo refractario funcional de la fibrilación ventricular.

**PRR**: periodo refractario relativo.

**PSN**: periodo supernormal.

**SarcK<sub>ATP</sub>**: canal de potasio ATP dependiente sarcolémico.

**SUR**: subunidades reguladoras del receptor de la sulfonilurea.

**TMD**: dominio transmembrana.

**T<sub>peak</sub>+T<sub>end</sub>**: índice de pico y final de la onda T.

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- **Figura 1.1.** Sistema de conducción eléctrica del corazón.
- **Figura 1.2.** Potencial de acción: fases y flujo iónico correspondiente.
- **Figura 1.3.** A. PA de membrana normal y respuestas a una serie de estímulos aplicados durante y al final de la repolarización y después de ella. B. Duraciones aproximadas del periodo refractario absoluto (PRA), periodo refractario total (PRT), periodo refractario efectivo (PRE), tiempo de recuperación total (TRT), periodo supernormal (PSN) y periodo refractario relativo (PRR).
- **Figura 1.4.** Distribución de las cargas intracelulares durante la propagación de un potencial de acción, desde la despolarización (fuente) al resto de la célula (sumidero).
- **Figura 1.5.** A, B y C. Registros de electrocardiogramas y potencial de acción de un corazón de cerdo al principio de un periodo isquémico (A), tras 12 min de isquemia (B), y en reperfusión (C).
- **Figura 1.6.** Con 5 días consecutivos de entrenamiento se puede observar una protección significativa contra el infarto de miocardio inducido por IR.
- **Figura 1.7.** Base estructural de la actividad del canal  $K_{ATP}$ .
- **Figura 2.1.** A: conejo de raza Nueva Zelanda Blanco. B: corazón aislado de conejo.
- **Figura 2.2.** Arriba izquierda: caja de puntas para micropipetas. Arriba derecha: DMSO. Abajo Izquierda: filtros Whatman. Centro: jeringas de 50ml. Abajo derecha: micropipeta Eppendorf.
- **Figura 2.3.A.** Sistema de control del tapiz.
- **Figura 2.3.B.** Tapiz rodante
- **Figura 2.4.** Material quirúrgico y rack de inmovilización para anestesia.
- **Figura 2.5.** Detalle del material quirúrgico y beaker con solución Tyrode a 4 °C.
- **Figura 2.6.** Columnas de vidrio, de doble camisa, del sistema de perfusión Langendorff.
- **Figura 2.7.** Baño termostático con bomba de recirculación.
- **Figura 2.8.** Al fondo de la imagen: botellón con Tyrode. Adelante: bomba peristáltica bombeando el Tyrode al sistema de perfusión.
- **Figura 2.9.** Corazón de conejo conectado a la cánula de perfusión del Sistema de Langendorff.
- **Figura 2.10.** Bomba de jeringa para anestesia P4000 IVAC.
- **Figura 2.11.** Grabación del registro electrocardiográfico durante el experimento.

- **Figura 2.12.** Estimulador GRASS S88R (abajo), con unidad de aislamiento de estímulos SIU5 (arriba).
- **Figura 2.13.** Sistema de cartografía MapTech®.
- **Figura 2.14.** A. Electrodo de registro bipolar auricular. B. Electrodo de estimulación ventricular. C. Electrodo de registro de múltiple canal.
- **Figura 2.15.** Detalle del electrodo de registro multicanal, con sus 256 electrodos unipolares.
- **Figura 2.16.** Preparación de Langendorff, con los sistemas de perfusión y de registro.
- **Figura 2.17.** Desfibrilador ad hoc.
- **Figura 2.18.** Racks para estabulación de los conejos
- **Figura 2.19.** Izquierda: conejo al interior de la jaula de estabulación. Derecha: conejo sobre el tapiz rodante, durante el entrenamiento físico.
- **Figura 2.20.** Conejo durante el entrenamiento de carrera sobre tapiz rodante.
- **Figura 2.21.** Distintos momentos de la preparación experimental: peso del animal, anestesia, cirugía para extracción del corazón, fijación del órgano en el sistema de Langendorff y posicionamiento de los electrodos.
- **Figura 2.22.** Balanza de precisión
- **Figura 2.23.** Captura de un registro electrográfico basal auricular y ventricular.
- **Figura 2.24.** Desfibrilando un corazón mediante la aplicación de un choque de onda, a través de las placas metálicas del desfibrilador ad hoc.
- **Figura 2.25.** Registro electrográfico de FV visualizado con el programa PaceMap®.
- **Figura 2.26.** Registro electrográfico de FV en el que se pueden apreciar las marcas efectuadas sobre los momentos de activación del proceso fibrilatorio y consecuentemente los intervalos VV entre dichos momentos.
- **Figura 2.27.** Representación de la distribución gaussiana a partir de los intervalos VV.
- **Tabla 3.1.** Media del PRFFV, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal, previamente a la oclusión arterial coronaria, y tras 5 mil después de la misma.
- **Figura 3.1.** Media y desviación estándar de la FD de la FV, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal (previamente a la oclusión arterial coronaria) y tras 60 s y 180 s, posteriores a la misma.
- **Tabla 3.2.** Media y desviación estándar de la FD de la FV, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal (previamente a la oclusión arterial coronaria) y tras 60 s y 180 s posteriores a la misma.
- **Tabla 3.3.** Media y desviación estándar de la FDMin y FDMax de la FV, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal (previamente a la oclusión arterial coronaria), y tras 60 s y 180 s posteriores a la oclusión. Los valores están expresados en Hz.

- **Figura 3.2.** Media y desviación estándar de la EN de la señal fibrilatoria, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal previamente a la oclusión arterial coronaria (OAC) y durante 60 s, 180 s y 300 segundos posteriores a la misma.
- **Tabla 3.4.** Media y desviación estándar de la EN de la señal fibrilatoria, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal previamente a la oclusión arterial coronaria (OAC) y durante los 60 s, 180 s y 300 segundos posteriores a la misma.
- **Figura 3.3.** Media y error estándar de la mínima energía que fue necesaria aplicar para desfibrilar los corazones de conejos, en cada uno de los tres grupos.
- **Tabla 3.5.** Media y desviación estándar de la LCS, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, antes y después de la infusión.
- **Figura 3.4.** Porcentaje de los corazones de conejos pertenecientes a los grupos control, entrenado y glibenclamida que desfibrilaron espontáneamente, tras haberles inducido una fibrilación ventricular.
- **Tabla 3.6.** Frecuencia de desfibrilaciones espontáneas ocurridas en cada uno de los corazones pertenecientes a los grupos control, entrenado y glibenclamida.
- **Figura 3.5.** Comportamiento desfibrilatorio espontáneo y recidivas fibrilatorias espontáneas exhibidas por los corazones de conejos pertenecientes a los grupos control, glibenclamida y entrenado.
- **Tabla 3.7.** Número de fibrilaciones espontáneas (recidivas) ocurridas, después de haber revertido la fibrilación (inducida con el TEEV), mediante choque de ondas bifásicas, en cada uno de los corazones de conejos pertenecientes a los grupos control, entrenado y glibenclamida.
- **Tabla 8.** Media y desviación estándar del peso corporal del conejo, peso de su corazón, ratio del peso del corazón/peso corporal y flujo coronario en cada uno de los tres grupos de estudio.



# **RESUMEN**

---



## RESUMEN

Se ha investigado en corazones de conejo aislados, perfundidos y en fibrilación ventricular (sin interrumpir la perfusión global) en situación de perfusión normalmente oxigenada y durante isquemia regional, el efecto de la aplicación de un protocolo de ejercicio físico sobre la refractariedad ventricular, la heterogeneidad electrofisiológica y la reversibilidad de la fibrilación tras la aplicación de choques eléctricos de ondas bifásicas (durante la isquemia regional). Han sido investigados, en otro grupo de conejos y con la misma metodología para el aislamiento del corazón, en normoxia y durante isquemia regional, el efecto de la infusión del bloqueante del canal  $K_{ATP}$ , glibenclamida, sobre los parámetros mencionados, para evidenciar las similitudes o las discrepancias, con las respuestas electrofisiológicas de los corazones de animales entrenados; todo ello con el fin de contribuir a dilucidar, al menos en parte, el papel del mencionado canal en los efectos protectores cardiovasculares del entrenamiento. Las propiedades y/o los parámetros analizados han sido: la refractariedad ventricular, determinando el periodo refractario funcional durante la arritmia (percentil 5 de los intervalos fibrilatorios) y a través del análisis espectral de la arritmia; la energía normalizada de la señal fibrilatoria (indicador de heterogeneidad electrofisiológica) y la respuesta del corazón en fibrilación a los choques eléctricos de ondas bifásicas y así determinar el “umbral desfibrilatorio”. Concluimos que 1. El efecto beneficioso del ejercicio físico crónico sobre la instauración de arritmias que amenazan la vida podría ser debido, al menos en parte, al incremento de la refractariedad miocárdica ventricular intrínseca observada en el presente trabajo, en situación de normoxia. 2. El mantenimiento de los valores de refractariedad, tras la oclusión coronaria, en la fase temprana de la isquemia, en los corazones de animales entrenados, contribuye a asentar que el ejercicio físico crónico parece mantener mejor el estatus metabólico de los cardiomiocitos. 3. Las modificaciones de los parámetros de refractariedad en la isquemia, en los corazones tratados con glibenclamida, parecen descartar la idea de que el entrenamiento protege bloqueando el canal. 4. El ejercicio físico crónico ejerce un efecto protector antiarrítmico dado el menor requerimiento de energía para revertir la fibrilación con choques. 5. La similitud de repuesta de los corazones tratados con glibenclamida y los de conejos entrenados, en el umbral desfibrilatorio, sugiere que el ejercicio opera a través del bloqueo del canal  $K_{ATP}$ . 6. Si la protección exhibida por el ejercicio físico crónico, opera a través del incremento de la corriente vehiculada por el canal  $K_{ATP}$ , que en opinión de la mayor parte de autores es arritmogénica, ¿cómo explicar que el ejercicio que exhibe protección antiarrítmica, lo hace a través de incrementar la corriente vehiculada por el mencionado canal, como se sostiene actualmente?



## ABSTRACT

The effect of applying a physical exercise protocol on the ventricular refractoriness, the heterogeneity electrophysiological and the reversibility of fibrillation after the application of electric shock of biphasic waves (during regional ischemia), has been investigated rabbit hearts which were isolated, perfused and in ventricular fibrillation (without interrupting global perfusion) in a situation of normally oxygenated perfusion and during regional ischemia. The effect of the infusion of the K<sub>ATP</sub> channel blocker, glibenclamide, on the mentioned parameters, has been investigated in another group of rabbits and with the same methodology for the isolation of the heart, in normoxia and during regional ischemia, to show the similarities or the discrepancies with the electrophysiological responses of the hearts of trained animals. This shall help elucidate, at least in part, the role of the aforementioned channel in the cardiovascular protective effects of training. The analyzed properties and/or parameters were the following: the ventricular refractoriness, determining the functional refractory period during arrhythmia (5th percentile of fibrillatory intervals) and through spectral analysis of arrhythmia; the normalized energy of the fibrillatory signal (indicator of electrophysiological heterogeneity) and the response of the heart in fibrillation to the electric shocks of biphasic waves and thus determine the “defibrillation threshold”. We conclude that

1. The beneficial effect of chronic physical exercise on the establishment of life-threatening arrhythmias could be due, at least in part, to the increase in intrinsic ventricular myocardial refractoriness observed in the present study, in a situation of normoxia.
2. The maintenance of the refractoriness values, after coronary occlusion, in the early phase of ischemia, in the hearts of trained animals, contributes to establishing that chronic physical exercise seems to better maintain the metabolic status of cardiomyocytes.
3. The modifications of the refractory parameters in ischemia, in hearts treated with glibenclamide, seem to reject the idea that training protects by blocking the channel.
4. Chronic physical exercise exerts an antiarrhythmic protective effect given the lower energy requirement to reverse shock fibrillation.
5. The similarity of response of the hearts treated with glibenclamide and those of trained rabbits, in the defibrillation threshold, suggests that the exercise operates through the blockade of the K<sub>ATP</sub> channel.
6. If the protection exhibited by chronic physical exercise operates through the increase in the current carried by the K<sub>ATP</sub> channel, which in the opinion of most authors is arrhythmogenic, how can we explain that the exercise that exhibits antiarrhythmic protection, does it by increasing the current carried by the aforementioned channel, as it is currently supported?



# **1. INTRODUCCIÓN**

---



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo general

Diversas investigaciones apoyan el efecto beneficioso del ejercicio físico crónico sobre diversos parámetros cardiovasculares (Harris y Starnes, 2001, Demirel *et al.*, 2001, Ramírez y Ji, 2001, Brown *et al.*, 2003). No obstante, los mecanismos por los que el ejercicio físico crónico protege frente a la muerte súbita, al menos en su totalidad, y pese que han sido múltiples los investigados, están por dilucidar, lo que ya venía planteándose desde hace algo más de una década y aún en la actualidad (Wannamethee y Shaper, 2001, Ascensao *et al.*, 2007, Hamer y Stamatakis, 2008, Lavie *et al.*, 2019). Investigaciones realizadas por diversos autores y por nosotros evidencian que el entrenamiento modifica beneficiosamente las propiedades electrofisiológicas que originan la instauración de fenómenos reentrantes (refractariedad y heterogeneidad electrofisiológica) y de la fibrilación ventricular (FV) (Hajnal *et al.*, 2005, Such *et al.*, 2008, Such-Miquel *et al.*, 2018). En este estudio se pretende seguir ahondando, en el corazón normalmente oxigenado y en el sometido a isquemia aguda regional, en el conocimiento de las modificaciones que produce el ejercicio físico crónico sobre la refractariedad funcional durante la fibrilación ventricular inducida, la estabilidad eléctrica del miocardio y las propiedades que subyacen a la mayor o menor facilidad para la desfibrilación mediante la aplicación de choques eléctricos como son la complejidad de la activación eléctrica, la heterogeneidad electrofisiológica y la refractariedad. Y ahondar también en algunos aspectos contradictorios en relación con la participación de los canales que vehiculan la corriente  $I_{K_{ATP}}$  en las modificaciones por el ejercicio, antes citadas.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Investigar en corazones aislados de conejos pertenecientes a un **grupo sometido a un protocolo de entrenamiento físico o a un grupo control**, ambos bajo situación de perfusión normalmente oxigenada y tras provocar isquemia regional:
  - El periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.
  - La frecuencia dominante media, máxima y mínima de la FV.
  - La energía normalizada de la señal fibrilatoria.
- Investigar **en un grupo bajo situación de perfusión normalmente oxigenada y tras bloquear los canales que vehiculan la corriente  $I_{KATP}$**  y provocar isquemia regional:
  - El periodo refractario funcional durante la FV.
  - La frecuencia dominante media, máxima y mínima de la FV.
  - La energía normalizada de la señal fibrilatoria.
- Determinar **en los tres grupos experimentales**, exclusivamente tras provocar isquemia regional, la energía mínima necesaria para revertir la fibrilación ventricular, mediante la aplicación de choques eléctricos de ondas bifásicas.

El significado de los parámetros investigados es el siguiente: el periodo refractario funcional está relacionado con la instauración y el mantenimiento de arritmias por reentrada, como la propia FV. La frecuencia dominante de la FV nos da una información indirecta de la refractariedad, propiedad con la que se halla relacionada. Asimismo, las modificaciones de este parámetro en la zona sometida a

oclusión coronaria se relacionan con el grado de deterioro de dicha zona. La energía normalizada de la señal nos da información indirecta de la regularidad de la señal y por tanto de la estabilidad electrofisiológica y de alguna manera pensamos también que indirectamente de la homogeneidad. Y finalmente, la energía mínima necesaria para desfibrilar nos puede dar una idea de la facilidad con que puede ser revertida la FV e indirectamente de las propiedades que subyacen al mantenimiento de la arritmia.

Por tanto, los objetivos específicos, que hemos enumerado anteriormente, pretenden dar respuesta a unos objetivos más amplios: conocer los efectos del ejercicio físico crónico sobre las modificaciones que la isquemia coronaria aguda produce a nivel de los parámetros relacionados con la instauración de la FV, principal causa de muerte súbita de origen cardiaco, e investigar la posible participación de los canales que vehiculan la corriente de potasio ATP dependiente ( $I_{KATP}$ ), como mecanismo básico potencialmente implicado en las citadas modificaciones.

## **1.2. JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS (ANTECEDENTES)**

“En la especie humana, las arritmias cardíacas son muy prevalentes en todos los grupos de edad y pueden darse tanto en el contexto de una cardiopatía subyacente como en corazones estructuralmente normales. Aunque las formas de presentación clínica de las arritmias son muy diversas, en las células comparten propiedades electrofisiológicas comunes. Los 3 mecanismos principales de las arritmias cardíacas son las alteraciones en el automatismo, la actividad desencadenada y la reentrada. Aunque la identificación del mecanismo específico a veces pueda resultar difícil para el clínico y requerir un estudio electrofisiológico invasivo, diferenciar y comprender el mecanismo subyacente puede ser crucial para desarrollar una correcta estrategia diagnóstica y terapéutica” (Gaztañaga *et al.*, 2012).

### **1.2.1. Consideraciones fundamentales sobre la electrofisiología cardiaca normal**

Los cardiomiocitos son células altamente especializadas, que se encargan tanto de la conducción de los impulsos eléctricos a nivel cardiaco como de la contracción mecánica. Para cumplir dicha función, las células miocárdicas poseen cuatro propiedades fundamentales que se describen a continuación:

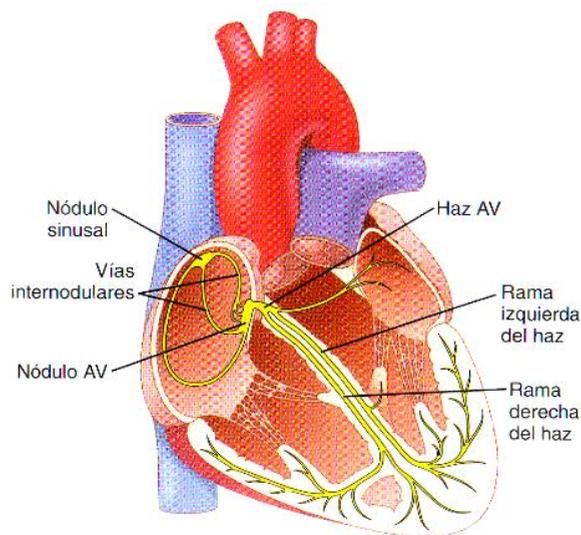
- **Automatismo o cronotropismo.** Es la propiedad inherente a alguno de los tejidos del corazón que permite originar dentro de sí mismos el impulso eléctrico que determina su posterior contracción. Los tipos celulares que exhiben esta propiedad son capaces de sufrir una despolarización diastólica espontánea e iniciar un impulso eléctrico en ausencia de estímulos externos (Opie y Downey, 2005). El automatismo normal está determinado por un fenómeno de despolarización espontánea que poseen las células del nodo sinusal y que también exhiben las células del sistema de conducción y que no está presente en condiciones fisiológicas en las células “normales” de trabajo del miocardio. La frecuencia de despolarización intrínseca de cada tipo celular es específica para cada parte del sistema de células marcapaso, nodales o automáticas, siendo más alta en condiciones fisiológicas en el nodo sinusal (60-100 lpm en reposo y de la del sistema de las ramas de Haz de His y fibras de Purkinje 20-30 lpm), con amplio solapamiento de frecuencia entre las zonas. Por ese motivo el “marcapasos fisiológico” del corazón es el nodo sinusal, ya que su frecuencia de despolarización intrínseca es la más alta (Efimov y Nikolski, 2006; citados por Salguero, 2012).
- **Conductibilidad o dromotropismo:** (de dromos = correr) es la propiedad de propagar los estímulos o potenciales de acción, a partir del marcapaso, a toda la musculatura cardiaca. Puesto que de ella

depende la velocidad con que viajan los estímulos se la conoce también como “propiedad dromotrópica”, (Segarra, 2006).

- **Contractibilidad o inotropismo:** (de inos = fibra) es la propiedad que tiene el corazón de contraerse al excitarse como consecuencia de los estímulos intrínsecos o extrínsecos. Casi todo el tejido cardiaco es potencialmente capaz de iniciar una onda de excitación eléctrica bajo ciertas condiciones y transmitirlo a las células vecinas, las cuales se contraerán (Segarra, 2006).
- **Excitabilidad o bathmotropismo:** (de bathmos = umbral) es la propiedad que tienen todas las células cardiacas de cambiar la polaridad eléctrica de su membrana en respuesta a un estímulo de amplitud suficiente, (Rodríguez y Cabrera, 2014), ya sea de tipo eléctrico, químico o mecánico (de los Nietos, 2006).

Como sabemos, cuando las células cardiacas se encuentran en estado de reposo, mantienen una diferencia de potencial entre su interior y su exterior denominado potencial de membrana en reposo (PMR), que a nivel de los miocitos ventriculares llega a ser aproximadamente de -90 mv. Este potencial, es causado fundamentalmente por la difusión de potasio desde el interior de la célula hacia el exterior, dado el gradiente de concentración entre ambos compartimentos, siendo la una concentración de potasio  $[K^+]$  intracelular unas 30 veces mayor que el extracelular mantenido por la bomba Na-K. Si se produce un estímulo eléctrico o mecánico la permeabilidad de la membrana se altera, y ocurre un rápido intercambio de iones, que provoca la despolarización celular. Este movimiento iónico pasa por varias fases hasta que retorna al valor inicial del potencial de membrana en reposo. El conjunto de estos cambios se denomina potencial de acción (PA) transmembrana (Rodríguez y Cabrera, 2014).

Los PA originados espontáneamente se propagan a través de los miocitos, que son células «excitables», es decir, capaces de responder a un estímulo con un PA regenerativo (Grant y Durrani, 2007). La correcta propagación del impulso cardíaco es posible gracias a las uniones *gap* o de hendidura, que son estructuras de membrana especializadas formadas por múltiples canales iónicos intercelulares que facilitan la comunicación eléctrica y química entre las células (Gaztañaga *et al.*, 2012), funcionando así como un sincitio cardíaco.



**Figura 1.1. Sistema de conducción eléctrica del corazón.** Nódulo sinusal y sistema de Purkinje del corazón, que muestra también el núcleo auriculoventricular (AV), las vías internodales auriculares y las ramas de los haces ventriculares. Tomado de Hall, 2016.

En condiciones normales, el nódulo sinusal (sinoauricular), con un potencial de membrana en reposo aproximado de -60 mv, es el marcapasos principal del corazón. Este nódulo presenta una actividad eléctrica espontánea, denominada despolarización diastólica espontánea (DDE) o prepotencial, en la que según estudios (Barbuti *et al.*, 2007) la despolarización diastólica (proceso de

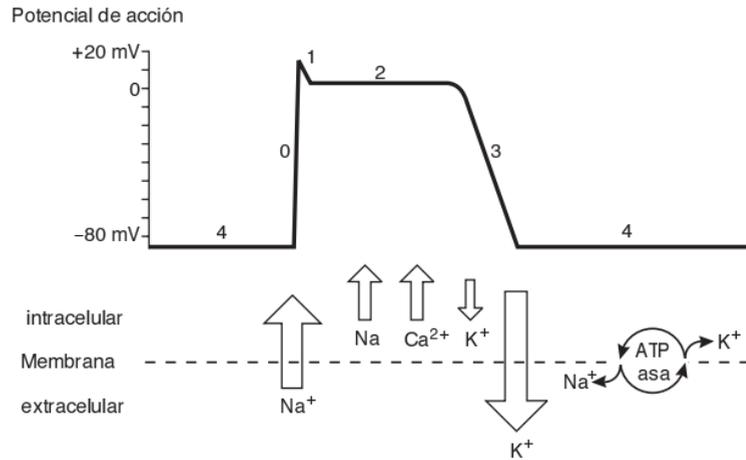
despolarización espontánea) durante la fase 4 del potencial de acción (PA), es la característica fundamental de las células del nódulo sinusal o sinoauricular. Las llamadas corrientes de entrada de calcio: la transitoria  $I_{Ca-T}$  y la de larga duración  $I_{Ca-L}$  son, en parte, responsables de este potencial de marcapaso.

Cuando el potencial de membrana en reposo alcanza aproximadamente -40 mV, se dispara el potencial de acción, cuya pendiente de ascenso es claramente más lenta que la de las células miocárdicas de trabajo debido a que en este caso no hay corrientes de entrada rápidas de sodio. En la fase de ascenso del potencial de acción participan las corrientes de entrada de calcio  $I_{Ca-L}$ , participando también la corriente  $I_f$  (*funny*).

La actividad conjunta de diversas corrientes de iones da lugar a una disminución del potencial de membrana. Cuando dicho potencial llega a -40 mV, se activan las corrientes de calcio (tipo  $I_{Ca,T}$ - y tipo  $I_{Ca,Long-Lasting}$ ), que son los transportadores iónicos que predominan durante la segunda parte de la despolarización diastólica, y es la  $I_{Ca,Long-Lasting}$  la responsable de la fase de ascenso del potencial de acción de las células marcapasos dependientes de  $Ca^{2+}$  (Opie, 2004, Barbuti *et al.*, 2007). Posteriormente, se activan las corrientes de salida de potasio ( $K^+$ ) y se inactivan las corrientes de  $Ca^{2+}$ . Es entonces cuando el potencial de membrana disminuye a causa del flujo de salida de  $K^+$ , el principal ion repolarizante del corazón. Así, al alcanzar el potencial de membrana en reposo, el ciclo se repite continuamente una y otra vez.

En reposo, los cardiomiocitos ventriculares de trabajo tienen un potencial de membrana de -90 mV. Al producirse un influjo de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ , a través de las uniones *gap*, el voltaje aumenta y hace que se aproxime al umbral (aprox. -65 mV) desencadenando un potencial de acción, en el cual es posible distinguir 5 fases (Gaztañaga *et al.*, 2012; Salguero, 2012):

- **Fase 0 o de despolarización rápida:** se produce el cambio repentino del potencial de reposo a la despolarización por la entrada rápida de  $\text{Na}^+$ . En este punto se abren los canales de  $\text{Na}^+$ , lo que origina una gran corriente de entrada de  $\text{Na}^+$ , pero transitoria.
- **Fase 1 o de repolarización rápida temprana:** se debe a una corriente transitoria breve de salida de potasio. La corriente de  $\text{Na}^+$  de la fase anterior, se inactiva rápidamente, tras lo cual se produce una corriente de salida de  $\text{K}^+$  que inicia la repolarización.
- **Fase 2 o de meseta:** la meseta, de aproximadamente 100 - 200 milisegundos de duración, se produce por el flujo de salida constante de  $\text{K}^+$  con el ingreso adicional de  $\text{Ca}^{2+}$ . Durante esta fase, la mayoría de los canales de  $\text{Na}^+$  están inactivados. Durante esta fase la  $I_{\text{Ca,L}}$  desempeña un papel importante, al oponerse a la corriente de  $\text{K}^+$ . La  $I_{\text{Ca,L}}$  es la principal vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y desencadena la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, con lo que se inicia la contracción del miocito.
- **Fase 3 o de repolarización rápida tardía:** debido a la salida continua de iones de  $\text{K}^+$ , causada por la activación de los canales de  $\text{K}^+$  rectificadores tardíos, y a la inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , se produce una interrupción de la fase de meseta y se inicia la repolarización tardía, marcada por la caída del potencial de membrana en dirección al potencial de membrana de reposo. La produce la corriente de salida de  $\text{K}^+$  por el canal llamado rectificador anómalo.
- **Fase 4 o de potencial de membrana de reposo y despolarización diastólica:** quien determina esta fase es el rectificador anómalo, el *inward rectifier*.



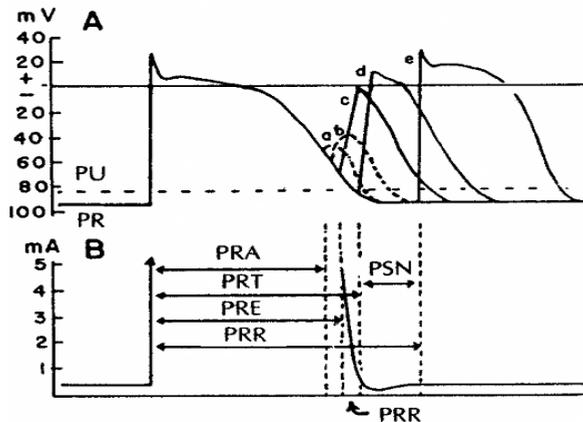
**Figura 1.2.** Potencial de acción: fases y flujo iónico correspondiente. Tomado de Salguero, 2012.

La excitabilidad del miocardio varía a lo largo del potencial de acción (PA), distinguiéndose varios periodos de tiempo con diferente excitabilidad (Hoffmann, 1969, citado por West, 1998):

- **El periodo refractario absoluto (PRA)**, durante el cual la membrana no puede ser re-excitada por un estímulo externo, con independencia del nivel de estímulo aplicado. El estímulo no es capaz de producir una respuesta propagada, ni tampoco local. El PRA no puede determinarse con exactitud en las redes de células, a causa de los diferentes tiempos de recuperación de las diversas células en la red.
- **El periodo refractario efectivo (PRE)** de una célula o red celular constituye el periodo durante el cual sólo puede producirse una respuesta local por un estímulo despolarizante más grande de lo normal. Así, durante el periodo refractario efectivo, la membrana puede responder, pero no puede generarse un potencial de acción propagado que transporte el impulso a través de toda la red celular.

- **Periodo refractario relativo (PRR)** durante el cual puede generarse un potencial de acción propagado, pero con un estímulo despolarizante que es mayor de lo normal; es decir, el mínimo estímulo despolarizante que pueda iniciar un potencial de acción propagado.
- En fibras de Purkinje y bajo ciertas condiciones en el músculo cardiaco de trabajo, hay un breve periodo de tiempo al final de la repolarización en el cual las células son realmente más excitables que en reposo: **el periodo supernormal (PSN)**, tiempo en el que se puede generar un potencial de acción propagado, a partir de un estímulo inferior al umbral.

El tiempo de recuperación total está constituido por el periodo desde que empieza el potencial de acción hasta el final del periodo supernormal, como se puede observar en la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** A. PA de membrana normal y respuestas a una serie de estímulos aplicados durante y al final de la repolarización y después de ella. B. Duraciones aproximadas del periodo refractario absoluto (PRA), periodo refractario total (PRT), periodo refractario efectivo (PRE), tiempo de recuperación total (TRT), periodo supernormal (PSN) y periodo refractario relativo (PRR). Tomado de West, 1998.

En las células ventriculares, que en general conducen con rapidez, la recuperación de la excitabilidad o refractariedad es principalmente dependiente del voltaje, mientras que, en las células de respuesta lenta, en general asociadas con una velocidad de conducción lenta, la recuperación es sobre todo dependiente del tiempo. De este modo, en las células del tipo de respuesta lenta, la repolarización de la célula hacia su potencial en reposo no coincide necesariamente con la recuperación de la excitabilidad (West, 1998).

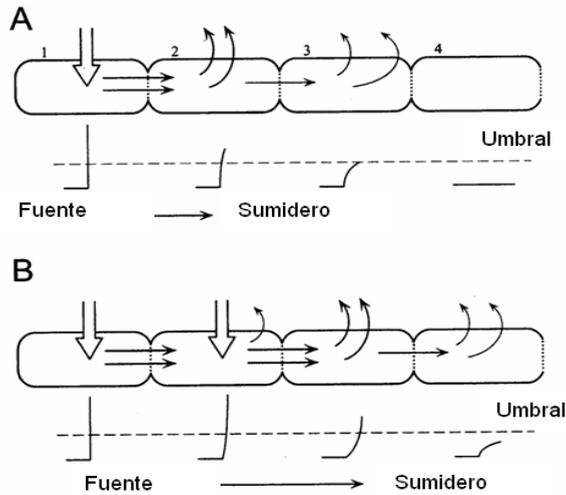
Los diferentes periodos refractarios ya mencionados, están basados en una serie de mecanismos iónicos que se detallan a continuación:

- **PRA:** en él no se dispone de más corrientes activas de entrada para conseguir despolarizar la membrana. Los canales de  $\text{Na}^+$  comienzan a inactivarse, a no conducir, durante la despolarización. Desde la inactivación, se requiere un periodo de recuperación para que estos canales puedan comenzar a conducir de nuevo (Jalife *et al.*, 1999).
- **PRE:** aquí no existe prácticamente movimiento de entrada de  $\text{Na}^+$  (Jalife *et al.*, 1999).
- **PRR:** ocurre cuando el potencial de membrana disminuye de -60 a -70 mV y entonces puede producirse un potencial de acción propagado. La tasa de movimiento de entrada de  $\text{Na}^+$  es tan lenta que es necesaria una intensidad de corriente mucho mayor para que el movimiento de entrada de  $\text{Na}^+$  alcance la suficiente rapidez para generar el potencial de acción, que será pequeño y lento, característico del bajo nivel de potencial de membrana que lo origina. Además, existe un movimiento de salida de iones de  $\text{K}^+$  a través de la membrana durante la repolarización, el cual tiende a contrarrestar los efectos de la estimulación catódica y de la corriente de entrada de  $\text{Na}^+$  (Mountcastle, 1974).

- **PSN:** ocurre cuando suficientes canales de  $\text{Na}^+$  son reactivados y el umbral para la activación está suficientemente cercano al normal (Jalife *et al.*, 1999).

En lo que respecta al proceso de conducción del impulso eléctrico por el miocárdico ventricular, como lo ilustra la Figura 1.3.A., al aplicar un impulso de corriente de despolarización en un extremo de una matriz de células dispuestas linealmente se producirá un potencial de acción en ese sitio, creando de esta manera un gradiente de voltaje entre la célula que ha disparado el potencial de acción y las otras células más distantes. Así pues, la corriente eléctrica se moverá a lo largo de este gradiente. La corriente de entrada (despolarizante), asociada con el incremento del potencial de acción en la célula activa, se convierte en una fuente de carga eléctrica para las células que están distales, pero en la misma dirección por la que cursa el impulso, las cuales actúan como un sumidero de corriente. Estas células, "que reciben" el impulso, se despolarizan debido a la llegada de cargas positivas por su interior. Para las células que están lejos de la fuente, el potencial electrotonico es subumbral, y su amplitud decae exponencialmente con la distancia (siguiendo propiedades de cable). Sin embargo, para la célula 2, la fuente de corriente provoca una despolarización suficiente para llevar esa célula a su potencial umbral, lo que dispara el potencial de acción.

En la Figura 1.3.B., el inicio de un potencial de acción en la célula 2 genera una nueva afluencia de corriente de entrada, en la misma dirección, en la matriz de células. La célula 2 ahora se convierte en una fuente de corriente para aquellas células que están más distales, y el proceso se repite mientras el potencial de acción se desplaza a lo largo de la fibra.



**Figura 1.4.** Distribución de las cargas intracelulares durante la propagación de un potencial de acción, desde la despolarización (fuente) al resto de la célula (sumidero). **A:** la fuente está localizada en la célula 1. **B:** la fuente se extiende a la célula 2. Modificado de Jalife *et al.* (1999).

Contrariamente al caso de un único miocito, donde todas las corrientes internas que entran al circuito descargan lo que es el capacitor de la célula, o sea la membrana celular, en el caso de la matriz solamente una fracción de la corriente despolariza cada célula. Una buena proporción de la corriente es usada para despolarizar las células contiguas. En otras palabras, hay un “efecto carga” impuesto por las células contiguas sobre la célula que está siendo activada. El “efecto carga” atrae cargas lejos del capacitor local (p.e., el capacitor en el lugar de excitación) y, consecuentemente previene la despolarización. (Jalife *et al.*, 2009).

El potencial de membrana en reposo está determinado por la corriente de salida de potasio, por lo tanto, cuando una célula se despolariza, el potencial de membrana se aleja del potencial de equilibrio para el potasio ( $E_K$ ). Sin embargo, sus canales de potasio permanecen permeables y por tanto se produce un flujo de salida de potasio. La corriente repolarizante se opone a la influencia de la corriente despolarizante, por lo que, en el caso del potencial de acción propagado, hay

corrientes de entrada y salida en movimiento, al mismo tiempo, en diferentes puntos de la fibra. Así como en el sitio de la excitación hay una entrada de cargas positivas, en los distales las cargas abandonan la fibra, a través de una corriente repolarizante. La “fuente” de corriente no es un elemento puramente pasivo en el circuito de propagación, sino que desempeña un papel activo importante, ya que de forma dinámica se opone a la despolarización de la fibra. (Jalife *et al.*, 2009).

La velocidad de propagación del impulso eléctrico, en los miocitos ventriculares, va a estar relacionada de una manera muy estrecha con la corriente de entrada despolarizante (fase 0 del potencial de acción) de  $\text{Na}^+$ , a diferencia del tejido nodal en el que tal corriente la produce el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ . De hecho y como es sabido, los antiarrítmicos de la clase I actúan sobre la fase 0 del potencial de acción, disminuyendo la corriente de entrada de sodio, y por tanto, la velocidad de conducción, como ocurre al administrar sustancias tales como la quinidina, procainamida o disopiramida, encainida, flecainida, etc., (Jalife, 1999).

La velocidad de la propagación del impulso eléctrico también puede modificarse en función de la mayor o menor densidad de comunicaciones intercelulares. Así, por ejemplo, en situaciones en las que se produce un incremento en la concentración de protones, como es el caso de la isquemia miocárdica, pueden causar cierre de los canales de las comunicaciones llamadas “*gap junctions*” o uniones en hendidura, y por tanto disminuir el movimiento de cargas eléctricas desde la fuente, para despolarizar a las células adyacentes (Jalife, 1999).

El tejido cardíaco no es un sincitio eléctrico totalmente homogéneo, puesto que contiene discontinuidades estructurales y heterogeneidades, tanto de las propiedades de la membrana celular, como de los componentes estructurales, tal como sucede con la distribución de las *gap junctions* (para revisión ver cita de Kléber y Rudy, 2004). Estos autores enfatizaron que los elementos que contribuyen a la

heterogeneidad presentan una mayor importancia en un sustrato remodelado por condiciones patológicas y son los principales determinantes de la formación de bloqueos de conducción, de la dispersión espacial de la repolarización, etc., factores estos implicados directamente en el establecimiento y perpetuación de las arritmias reentrantes.

A la heterogeneidad eléctrica se atribuye un papel fundamental en la aparición y perpetuación de las arritmias por re-entrada (para revisión ver cita de Jalife, 2000). Han y Moe (1964) citados por Jalife (2000), establecieron la importancia de la heterogeneidad en el período refractario para la inducción de fibrilación ventricular. Se había demostrado anteriormente que la fibrilación auricular podía persistir con una serie de características (p.ej.: autosostenida e independiente de su agente productor), pero únicamente si existía una inhomogeneidad en la repolarización (Moe y Abildskov, 1959). 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, como hemos dicho en el párrafo anterior, lo que se agrava ostensiblemente en situaciones patológicas, como es el caso de la isquemia. Este incremento de heterogeneidad es responsable de la aparición de bloqueos en la conducción, dispersión espacial de la repolarización etc. (Kléber y Rudy, 2004), lo que a su vez facilita la aparición del fenómeno de la re-entrada y las arritmias ligadas al mismo.

## **1.2.2. Alteraciones miocárdicas producidas por la isquemia aguda**

### ***1.2.2.1. Generalidades***

Para entender las consecuencias a nivel cardíaco es necesario conocer, y por lo cual describiremos a continuación, las consecuencias que a nivel general genera la isquemia, especialmente a nivel bioquímico, así como también a nivel de las corrientes iónicas a través de las membranas del cardiomiocito, al igual que sobre las concentraciones de los diferentes iones y sobre algunos otros parámetros, siguiendo la clásica revisión de Carmeliet (1999) y revisiones que tratan el tema refiriéndose a algunos aspectos de forma más concreta (Billman, 1994; Kloner y Jennings, 2001; Opie, 2004; Buja, 2013).

A nivel bioquímico, bajo condiciones aeróbicas normales, la tasa de recambio de fosfatos de alta energía es de 31 a 40 moles/g de tejido húmedo/min y la tasa de almacenamiento es de 15 moles/gramo de tejido húmedo, por lo cual el tiempo máximo para el agotamiento de los fosfatos es corto y es tan solo de 15-30 s. Al caer el oxígeno a un nivel crítico en el citoplasma, el transporte de electrones y el proceso de eyección de  $H^+$  en las mitocondrias se detienen. Como la energía almacenada se vuelve insuficiente para sintetizar el adenosintrifosfato (ATP) en cantidades apropiadas, entonces parte de la energía en forma de ATP podría ser usada para mantener el potencial de membrana mitocondrial ( $E_m$ ) y para inhibir las reacciones irreversibles que conducen a la muerte celular, lo que podría esperarse que cause un descenso de la [ATP] y un aumento de la concentración de adenosindifosfato (ADP). Sin embargo, la célula tiene diferentes maneras de mantener los niveles adecuados de ATP: (1) las demandas de energía caen muy rápidamente durante los primeros 30 s de isquemia a consecuencia de una falla en la contracción, (2) una importante cantidad de fosfocreatina es continuamente usada para realmacenar ATP a partir de ADP con un incremento concomitante en fosfato

inorgánico ( $P_i$ ), y (3) la glucólisis anaerobia comienza y se intensifica. A pesar de lo anterior, es posible seguir manteniendo una eficiente cantidad de ATP en situación de privación de oxígeno porque se dan las siguientes circunstancias: 1) El propio fallo de la contracción debido a la isquemia provoca una disminución de las demandas energéticas muy rápidamente durante los primeros 30 segundos. 2) Se produce formación de ATP gracias a la fosfocreatina, que fosforiliza al ADP a través de la reacción catalizada por la creatinfosfoquinasa (CPK); 3) Hay producción de ATP a expensas de la glucólisis anaerobia que en situación de isquemia cobra especial importancia muy especialmente por la activación de las enzimas fosfofructoquinasa, piruvatoquinasa y la primera enzima de la glucólisis que transforma a la glucosa en glucosa-6-fosfato, esto es la hexoquinasa\_(desde las terminaciones nerviosas, se produce una liberación masiva de catecolaminas que estimulan la actividad glucolítica y producción de lactato). 4). Hay un incremento de la glucogenolisis que proporcionará glucosa ya que la fosforilasa a se transforma en fosforilasa b (forma activa) lo cual es facilitado por el incremento de AMP (adenosinmonofosfato),  $P_i$ , calcio y AMP 3',5' cíclico. Y finalmente el transporte de glucosa a través de la membrana celular está aumentado. Estas situaciones permiten mantener una concentración de ATP bastante constante durante los primeros minutos de isquemia (para revisión ver Carmeliet, 1999).

En cuanto al metabolismo de los ácidos grasos ocurren dos principales cambios. Primero, la inhibición isquémica de la oxidación de los ácidos grasos (básicamente por privación del flujo y oxígeno) conduce a una acumulación de metabolitos lipídicos, incluyendo ácidos grasos libres a nivel intracelular, acetyl-CoA y acilcarnitina. Como el contenido de los metabolitos incrementa, se cree que se inhiben varios aspectos de la función de la membrana, tales como la translocasa mitocondrial, la bomba de sodio y los ciclos fosfolipídicos. Segundo, los fosfolípidos de la membrana están degradados por la acción de las fosfolipasas, activadas por una acumulación de calcio dentro de la célula isquémica. Las altas concentraciones de

productos de desecho acumulados forman micelas, las cuales son de membrana altamente activa. Tales eventos podrían en parte explicar las arritmias ventriculares en la isquemia temprana (para revisión ver Opie, 2004).

No obstante, a pesar del efecto beneficioso que puede significar la puesta en marcha de la glucólisis anaerobia, ésta produce un gran incremento del lactato a expensas del piruvato ya que éste último no puede oxidarse aeróbicamente y la lactato deshidrogenasa (LDH) conjuntamente con la nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa (NADH) reduce al piruvato para, como acabamos de decir, transformarlo en lactato. La formación de lactato y el acúmulo del mismo implica un incremento en la producción de  $H^+$ , siendo esta disminución del pH debida a la activación de la glucólisis la que acabará frenando dicha ruta metabólica y por lo tanto reduciendo drásticamente la producción de ATP. La caída del ATP junto con el incremento del ADP acaba teniendo consecuencias deletéreas sobre los transportadores que requieren ATP. Un cambio adicional que se produce como consecuencia de que la energía libre de la hidrólisis del ATP excede a la energía almacenada en el gradiente electroquímico de protones es que puede haber una hidrólisis neta de ATP y la ATP-sintasa actúa como una ATP hidrolasa utilizándose la energía para reponer el gradiente eléctrico en la mitocondria. Otra alteración que acaba produciéndose en la mitocondria es la despolarización de su membrana, aunque esto no ocurre de modo inmediato ni ligado a la interrupción del flujo de electrones, sino que ocurre ligeramente más tarde, ya que todavía se produce ATP a expensas de la glucólisis. Cuando este último proceso se bloquea se produce una importante depleción de ATP y un incremento de la concentración intracelular de calcio. Por otra parte, la caída del ATP por debajo de ciertos niveles y el incremento de la concentración de protones, calcio, fosfato y acilcarnitinas de cadena larga acaba originando la activación del llamado poro de transición o megacanal por el cual la mitocondria llega a ser anormalmente permeable en el sentido de dejar salir una serie de sustancias desde el interior de la misma, siendo este poro activado en la membrana

interna de la mitocondria. Al fin, todas estas circunstancias (bloqueo en el metabolismo oxidativo, disminución del cociente ATP/ADP, etc.) acaban produciendo consecuencias tales como las alteraciones del metabolismo lipídico, la producción del estrés oxidativo, la liberación de catecolaminas, las alteraciones de las concentraciones iónicas, etc. Los poros que se abren atravesando la membrana interna mitocondrial crean una situación similar a la que crean los agentes desacopladores de la fosforilación oxidativa. En condiciones de normal oxigenación, con concentración normal de oxígeno y ATP estos poros de transición o megacanales están inactivos, mientras que se activan en la isquemia, situación en la que la situación bioquímica se invierte en lo que al calcio y al ATP se refiere. Estas consecuencias serán en gran medida la base sobre la que se asientan las modificaciones electrofisiológicas propias de la isquemia, alguna de las cuales son las que presentamos en el presente trabajo de investigación (para revisión ver cita de Carmeliet, 1999).

La oncosis y la apoptosis son el resultado de la activación de vías subcelulares distintas pero superpuestas que involucran a los receptores de muerte de la membrana celular, el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Sin embargo, varias líneas de evidencia han convergido para mostrar que las mitocondrias tienen un papel central en la patogénesis de la lesión celular. En las células estresadas, los efectos nocivos y benéficos que actúan sobre las mitocondrias están mediados por los canales de muerte y rutas de “rescate”, respectivamente. Los canales mitocondriales de muerte incluyen el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) y el canal de la apoptosis mitocondrial. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial es un canal dependiente de voltaje que está regulado por el calcio y por el estrés oxidativo. La vía mitocondrial parece ser dominante en el componente de la apoptosis de la lesión isquémica del miocardio. Un evento central en oncosis es la apertura temprana del PTPm en la membrana mitocondrial interna, que se produce sin la liberación del citocromo c. La apertura del poro de

transición de permeabilidad mitocondrial resulta en una pérdida inmediata de la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana interna, con el resultante cese de la síntesis de ATP, afluencia de soluto e hinchazón mitocondrial. Entre otros mecanismos, un modesto aumento en la expresión de la proteína desacoplante-2 puede causar una rápida disminución en el potencial de membrana mitocondrial y en el nivel de ATP, lo que resulta en oncosis. Las interrelaciones entre la apoptosis y la oncosis han sido confirmadas por los modelos que implican la apoptosis inicial seguida de oncosis y a la inversa, oncosis seguida por apoptosis. En cardiomiocitos isquémicos, la falta de oxígeno impide el transporte de electrones en la mitocondria, con lo que se dispone de componentes de la cadena de transporte de electrones que pueden generar radicales libres de oxígeno cuando se restablezca el oxígeno. De hecho, en la reperfusión se produce allí, en la forma de un estallido oxidativo, una desviación masiva de electrones desde el sistema de transporte de electrones para la generación de radicales de oxígeno. Simultáneamente, se produce una gran entrada de calcio. Un primer objetivo del exceso de radicales libres y de calcio es el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, los cuales resultan abriendo el poro de transición de permeabilidad mitocondrial y colapsando la función mitocondrial. Este es un evento central en la lesión isquémica por reperfusión (para revisión ver Buja, 2013).

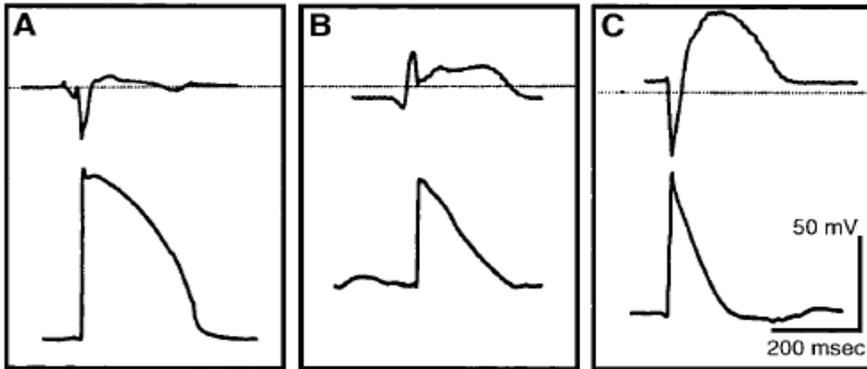
En relación a las modificaciones de las concentraciones iónicas, durante la isquemia se producen una serie de alteraciones ligadas a la modificación de las concentraciones de diferentes iones y que describiremos de manera sucinta a continuación (para revisión ver cita de Carmeliet, 1999). En la célula prematuramente isquémica las alteraciones en el potasio extracelular se producen en tres fases: Durante los primeros 10 - 15 minutos se produce un rápido incremento en su concentración extracelular, seguida por una fase de meseta, que dura aproximadamente otros 15 minutos y durante la cual las concentraciones de  $K^+$  no varían notablemente. Finalmente se produce un nuevo incremento, más lento e

irreversible. El incremento de la salida de  $K^+$  se debe a la existencia de una corriente de fuga hacia adentro ( $I_{Na}$ ,  $I_{NSC}$  e  $I_{Cl}$ ) la cual mantiene el potencial de membrana positivo con respecto al potencial de equilibrio del potasio, concomitante con un incremento de la conductancia al  $K^+$  (activación de  $I_{K_{ATP}}$ ,  $I_{K_{AA}}$  and  $I_{K_{Na}}$ ). El efecto de la elevada concentración de  $K^+$  extracelular, es indirecta a través de la despolarización. El resultado final es inexcitabilidad y bloqueo de la conducción. Los incrementos rápidos de potasio extracelular durante la isquemia miocárdica se correlacionan con el inicio de las arritmias ventriculares. La acumulación de potasio extracelular puede inducir a anomalías en la conducción y en la generación del impulso. Las inhomogeneidades en la conductancia del potasio provocarán diferencias regionales en la duración del potencial de acción y en la repolarización. La resultante de la dispersión espacial del período refractario permitirá por fragmentación de la conducción del impulso en los tiempos subsiguientes, la formación de vías de reentrada irregulares y la fibrilación ventricular. En una manera similar, la propagación de la corriente de lesión desde el tejido isquémico al tejido circundante normal puede desencadenar extrasístoles inducidas por despolarización automática (Billman, 1994). También durante la isquemia, la concentración de  $Na^+$  intracelular ( $[Na^+]_i$ ) aumenta de 10 a 20 mM tras 20-30 min. El mecanismo es el de una reducción del bombeo hacia fuera de la célula (por la caída en la energía libre de hidrólisis de ATP por las acilcarnitinas de cadena larga y radicales libres), y un incremento en el flujo hacia el interior (a través del intercambiador  $Na^+/H^+$ , y las corrientes  $I_{Na}$ ,  $I_{NSC}$ , e  $I_{Cl}$ ). El efecto del incremento de la  $[Na^+]_i$  es la activación de la bomba y eventualmente de la  $I_{K_{Na}}$ . En situación de isquemia las corrientes de potasio activadas por ligando ( $I_{K_{ATP}}$  y  $I_{K_{AA}}$ ) llegan a ser primordiales.

La concentración de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]$  varía en función del compartimento celular (citosol, mitocondria y retículo sarcoplásmico) y de las fases del ciclo cardíaco, en condiciones aeróbicas. Se produce un aumento importante del calcio citosólico durante la isquemia, pero la salida de calcio es heterogénea en

función de la fase del ciclo. Mientras la  $[Ca^{2+}]$  sistólica puede aumentar transitoriamente durante los primeros min, la  $[Ca^{2+}]$  diastólica solamente incrementa después de un retraso de 10-20 min. En la mitocondria, la  $[Ca^{2+}]$  sigue los cambios en el nivel citosólico, aunque puede existir una liberación inicial si la  $[Ca^{2+}]$  en la mitocondria es mayor que en el citoplasma al inicio de la isquemia. El incremento de la  $[Ca^{2+}]$  citosólica se debe a una menor eficiencia de la eliminación hacia el espacio extracelular a través del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , a una reducción en la captación en el retículo sarcoplásmico, a una fuga hacia adentro incrementada y a un desplazamiento por los protones desde el sitio de unión. Un aumento citosólico de la  $[Ca^{2+}]$  activa un número de canales, transportadores y enzimas y modula otros. El resultado es la ocurrencia de postdespolarizaciones tardías y arritmias. Al incrementarse el calcio citosólico, se activan múltiples y diferentes canales, transportadores y enzimas. El resultado de esta activación conduce finalmente a arritmias letales (para revisión ver Carmeliet, 1999).

También en la isquemia, en cuanto al  $pH_i$  y el  $pH_o$  se sabe que caen una unidad o más. La caída es causada por una producción incrementada de protones y una reducción de la eliminación los mismos. La mayoría de los canales de la membrana plasmática, con excepción del  $K_{ATP}$  y el  $K_{AA}$ , así como también las uniones *gap*, el canal de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico y la corriente de intercambio  $Na^{2+}/Ca^{2+}$ , están inhibidos; algunos por la acidosis extracelular y otros por la acidosis intracelular. Los mecanismos para los canales son una disminución en la conductancia y/o una reducción en la probabilidad de apertura. En la mayoría de casos, excepto para el  $K_r$ , el efecto es independiente del voltaje. Esos cambios resultan en despolarización, prolongación del potencial de acción y ocurrencia de las postdespolarizaciones tardías (para revisión ver Carmeliet, 1999).



**Figura 1.5. A, B y C:** Registros de electrocardiogramas y potencial de acción de un corazón de cerdo al principio de un periodo isquémico (A), tras 12 min de isquemia (B), y en reperusión (C). El potencial cero para electrogramas se indica por una línea de puntos. Nótese el decremento en el potencial de acción en la reperusión, asociado con un pico de la onda T y un cambio del nivel TQ en una dirección positiva. Estos cambios están acompañados por una caída de la  $[K^+]_o$  bajo control (adaptado de Carmeliet, 1999)

Entre otros efectos sobre canales iónicos activados por ligando (para revisión ver Carmeliet, 1999): encontramos los producidos por una liberación de catecolaminas al sistema circulatorio, seguido más tarde (10 min) por una liberación local causada por el bloqueo de los mecanismos de recaptación en las terminaciones nerviosas. Al mismo tiempo, el número de receptores  $\alpha$  y  $\beta$  están acoplados a sus canales efectores a través de complejas vías: el acoplamiento podría ser directo a través de la proteína G o indirecta a través de un número de fosfolipasas (receptores  $\alpha$ ) o adenilato ciclasa (receptores  $\beta$ ). La estimulación del receptor  $\beta$  causa el incremento de algunas corrientes  $IK^+$  pero la disminución de otras, causa también la disminución de la conductancia de las uniones *gap* y la estimulación de los intercambiadores  $Na^+/Ca^{2+}$ ,  $Na^+/K^+$  y  $Na^+/H^+$ . A nivel celular, el potencial de reposo podría despolarizarse o hiperpolarizarse; el potencial de acción en la mayoría de preparaciones es prolongado. Las postdespolarizaciones tardías están aumentadas cuando han sido causadas por la fuga incrementada de corriente hacia adentro de  $Ca^{2+}$ ; ellas podrían ser inhibidas cuando se induce por bloqueo de la inhibición de la

bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ . La activación del receptor  $\beta$  resulta en estimulación de la mayoría de las corrientes de membrana plasmática (corrientes hacia afuera o hacia adentro), canales de uniones *gap* y el canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico. Electrofisiológicamente, la activación del receptor  $\beta$  incrementa la actividad marcapaso, mejora la conducción nodal y eleva y acorta la meseta del potencial de acción. La estimulación excesiva podría resultar en una sobrecarga de calcio y una actividad de desencadenada.

Además de catecolaminas, se produce también una liberación de adenosina y acetilcolina (esta última por estimulación de reflejos vagales durante la isquemia). En general, los efectos producidos por estas sustancias al estimular los receptores muscarínicos y purinérgicos respectivamente son opuestos a los producidos por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica.

Los receptores muscarínicos son activados por la adenosina. El receptor cardíaco muscarínico dominante es el llamado M2. Su densidad es entre 2 y 5 veces mayor en las aurículas que en los ventrículos. Estos receptores se ligan directamente al canal de potasio, facilitando la salida de  $\text{K}^+$  y repolarizando la célula.

Los receptores denominados purinérgicos son activados por la acetilcolina. El receptor cardíaco purinérgico dominante es el llamado A1. Su densidad es mayor en el nodo sino-auricular, en el nodo aurículo-ventricular y en las aurículas. Este receptor se liga al canal de potasio, facilitando la salida de potasio, acortando el potencial de acción y permitiendo la hiperpolarización.

### ***1.2.2.2. Estudio especial de las modificaciones electrofisiológicas por la isquemia***

La interrupción de la circulación coronaria provoca la despolarización del potencial de membrana en reposo, acortamiento de la duración del potencial de acción, y prolongación del periodo refractario efectivo. La excitabilidad puede incrementarse temporalmente, pero cae después de 2-3 min. Los cambios no son uniformes. A nivel electrocardiográfico, los segmentos de TQ y ST se desplazan y las ondas T se invierten. El aumento de la concentración extracelular de potasio y la existencia de la corriente de entrada de sodio son responsables de la despolarización. La menor duración del potencial de acción es producida por un incremento en la salida de potasio y de cloruro. En la zona limítrofe entre la zona normalmente perfundida y la más dañada, el acortamiento es inducido por una corriente de lesión. La prolongación del periodo refractario efectivo se debe a la recuperación más lenta de la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$ . El aumento de la excitabilidad seguido de una disminución está relacionado con la extensión de la despolarización. La recuperación parcial de la excitabilidad ha sido explicada por la liberación de catecolaminas. Una caída en la conductancia de las uniones “*gap*” puede también ser responsable de un incremento en el factor de seguridad de la conducción. La alteración de la conducción es debida a una caída en la conductancia al  $\text{Na}^+$  y más tarde a un aumento de la resistencia longitudinal (para revisión ver Carmeliet, 1999).

Se sabe clásicamente que la velocidad de conducción disminuye con el proceso isquémico y múltiples revisiones ya clásicas también recogen esta observación (Carmeliet, 1999). La velocidad de conducción se halla deprimida en circunstancias de incremento de la concentración extracelular de potasio, como ocurre en la isquemia, especialmente durante el periodo refractario relativo. Desde los primeros instantes de la isquemia, el aumento de la concentración extracelular de potasio causa inactivación de los canales rápidos de sodio y por tanto una depresión en la corriente generada durante el trazado ascendente del potencial de acción, con

lo que disminuye la resistencia de la membrana y disminuye la eficacia estimuladora de la corriente de sodio, todo lo cual lleva a una caída de la velocidad de conducción del potencial de acción (Carmeliet, 1999).

Así mismo, Harper *et al* (1993) observaron, en el corazón porcino aislado, que el componente dependiente de frecuencia en el estado estacionario, responsable del enlentecimiento de la conducción intraventricular inducido por la isquemia aguda, ocurre por el aumento de potasio, en ausencia de un componente dependiente de frecuencia. Asimismo, el incremento de la concentración extracelular de potasio por eflujo del mismo desde los tejidos isquémicos produce una reducción en la duración del potencial de acción, lo que puede producir anomalías en la conducción del impulso (Billman, 2008).

Por otro lado, mediante un sistema de mapeo óptico de la actividad eléctrica del corazón, Yang *et al.*, (2007) detectaron cambios progresivos en los efectos electrofisiológicos producidos por la isquemia, encontrando lo que ya más clásicamente y con medios más “rudimentarios” se sabía, en el sentido de una reducción en la duración del potencial de acción de la pendiente de ascenso del mismo, la refractariedad post-repolarización y un claro enlentecimiento de la velocidad de conducción, lo que concordaba con sus resultados obtenidos mediante simulaciones por ordenador. La isquemia también puede originar el bloqueo unidireccional de la conducción, que puede ser la causa de inicio de la reentrada.

Según Billman (2009), se ha demostrado que la isquemia miocárdica induce anomalías en la repolarización que pueden proveer un sustrato para las arritmias ventriculares (Dun *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2000; Lue *et al.*, 1992; Nattel *et al.*, 2007; Pinto y Borden, 1999; Roden y Yang, 2005; Sridhar *et al.*, 2008).

Pues bien, los cambios anteriormente mencionados no ocurren homogéneamente en el miocardio ventricular, ocasionándose una heterogeneidad que es especialmente acusada en la zona intermedia entre el miocardio sano y la zona isquémica más dañada.

Además de las consideraciones precedentes, ha sido demostrada experimentalmente la existencia de una respuesta diferente del epicardio ventricular respecto al endocardio. En concreto, en felinos se ha evidenciado una mayor sensibilidad a la isquemia del epicardio ventricular (Gilmour y Zipes, 1980; Kimura *et al.*, 1986, 1990, 1991; Taggart *et al.*, 1988, Furukawa, 1991, citados por Antzelevitch *et al.*, 1991). Estudios de isquemia *in vivo* han mostrado que, si bien la conducción en el epicardio se halla deteriorada y fraccionada, no ocurre igual en el tejido sub-endocárdico, que presenta una conducción más conservada (Boineau y Cox, 1973; Scherlag *et al.*, 1974; Williams *et al.*, 1974; Elharrar *et al.*, 1977; Ruffey *et al.*, 1979; citados por Antzelevitch *et al.*, 1991).

La isquemia produce una sensibilidad no homogénea entre las células endocárdicas y epicárdicas en cuanto a la activación del canal de potasio dependiente de ATP, de tal modo que la diferencia entre endocardio y epicardio estriba en que pequeñas reducciones en la concentración de ATP son suficientes para activar el correspondiente canal de potasio (Furukawa *et al.*, 1991, citado por Billman, 2008), quien como resultado de su activación generará heterogeneidad por una serie cambios: concentración extracelular de potasio, refractariedad, duración del potencial de acción (Zipes y Wellens, 1998; Kimura *et al.*, 1986; Furukawa *et al.*, 1991, citados por Billman, 2002). Precisamente la heterogeneidad en los periodos refractarios da origen a procesos re-entrantes y a arritmias tan graves como la propia fibrilación ventricular.

El periodo refractario (PR) y la duración del potencial de acción (DPA) están íntimamente ligados en el músculo ventricular no isquémico. Después de un minuto de isquemia, la correlación entre el periodo refractario y la duración del potencial de acción se pierde en corazones humanos. Debido a la difusión de iones en la zona fronteriza de la isquemia, se observó que los periodos refractarios eran más cortos en una parte intermedia de la zona fronteriza que en la zona normal, mientras que hacia la región isquémica central se alargaban considerablemente (Zipes y Jalife, 2006).

Sutton *et al.* (2000), encontraron que el periodo refractario efectivo (PRE) se alargó durante un corto periodo de isquemia global en el corazón humano, tanto usando estímulos de alta como de baja intensidad. El potencial refractario efectivo se aproximó a la duración del potencial de acción monofásico y hubo una buena correlación entre ambos previamente a la isquemia. No obstante, durante la isquemia se acortó la duración del potencial de acción monofásico, mientras el PRE se incrementó, produciéndose una refractariedad tras la repolarización desde los instantes más prematuros de la isquemia. El alargamiento de la refractariedad por la isquemia ya había sido descrito por diversos autores (Elharrar, 1977; Horacek, 1984., y Capucci, 1995; citados por Sutton *et al.*, 2000); si bien otros autores (Elharrar, 1977; Kuppersmith, 1975; Ramanathan, 1977; Batsford, 1978; Stewart, 1980; Kimura, 1986; y Wolk, 1998; citados por Sutton *et al.*, 2000) hallaron un acortamiento de los periodos refractarios. Probablemente los diferentes resultados están en relación con las diferentes metodologías empleadas para medir los periodos refractarios.

En relación a la refractariedad post-repolarización que se produce en la isquemia, completada la repolarización, sigue estando refractario el miocardio ventricular y probablemente se debe a los efectos combinados de la falta de aporte de oxígeno y el acumulo extracelular de potasio. Los cambios observados en la

duración del potencial de acción monofásico y en la refractariedad en humanos en respuesta a la isquemia, muestran un curso temporal más rápido que en los observados en experimentación animal (Coronel *et al.*, 1997, citado por Sutton *et al.*, 2000).

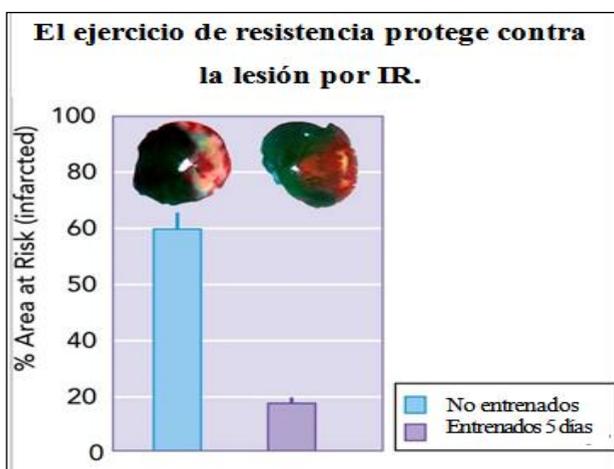
Precisamente la heterogeneidad que produce la isquemia en términos de dispersión del periodo refractario es una de las principales causas de arritmias ventriculares. Entre los primeros 10 a 15 minutos de la isquemia se producen la mayoría de las arritmias derivadas de la misma, que están provocadas por activaciones focales y reentradas transparietales. Al inicio de la taquicardia ventricular contribuyen tanto las diferencias en el flujo sanguíneo coronario entre las regiones isquémicas y las sanas, como las respuestas celulares heterogéneas a la isquemia.

### **1.2.3. El ejercicio físico crónico como maniobra antiarrítmica no farmacológica**

La realización de ejercicio físico ejerce un efecto protector cardiovascular, no solamente en personas sin trastornos cardiovasculares sino también en sujetos con problemas cardiovasculares (Jeon *et al.*, 2019). Investigaciones muy recientes han ido dirigidas a investigar los mecanismos por los que el ejercicio físico ejerce un efecto protector en el infarto miocárdico (Guo *et al.*, 2020). Que el ejercicio físico fuera propuesto por diferentes autores como una maniobra anti arrítmica no farmacológica hace ya algunas décadas (Billman, 2002, 2009). Según diversas revisiones, (Quindry y Hamilton, 2013; Powers *et al.*, 2014), en los países industrializados las enfermedades cardiovasculares (ECV), incluyendo la lesión por isquemia-reperusión (IR), continúan siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad, por lo que se ha pretendido investigar los diversos mecanismos por los cuales el ejercicio actúa protegiendo al corazón.

Ha sido establecido que episodios repetidos de ejercicio mejoran la tolerancia del miocardio a IR en los animales, lo que se conoce comúnmente como cardioprotección inducida por el ejercicio. Con tan solo cinco sesiones de ejercicio en días consecutivos es posible producir rápidamente un fenotipo cardiaco que protege contra la lesión miocárdica inducida por la IR (Power *et al.*, 2014). De hecho, un estudio clásico de Paffenbarger *et al.*, en 1970 demostraron que, en contraste con el ejercicio formal, el trabajo relacionado la actividad física por sí sola se asoció con una menor incidencia de la mortalidad por ECV y se concluyó que "*la asociación entre la actividad laboral y la mortalidad coronaria... sugiere que la actividad física influye en el miocardio o su función más que el proceso aterosclerótico*" (Tomado de Quindry y Hamilton, 2013).

Algunos estudios demuestran que el corazón ejercitado es resistente a la a la IR incluyendo arritmias (Hamilton *et al.*, 2004; Quindry *et al.*, 2010), aturdimiento miocárdico (Starnes J.W., 2007; Starnes J.W., 1995; Starnes J.W., 2005; Starnes J.W., 2003; Lennon S.L., 2004; Lennon S.L., 2004; Lennon, 2004) e infarto de miocardio (Demirel *et al.*, 1998; Demirel *et al.*, 2001; Hamilton *et al.* 2001, 2003; Quindry *et al.* 2007), como se observa en la Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Con 5 días consecutivos de entrenamiento se puede observar una protección significativa contra el infarto de miocardio inducido por IR. Tomado de Hamilton *et al.*, 2003.

En comparación con diversas investigaciones propuestas para la protección de la lesión por IR, el acondicionamiento ligado al ejercicio constituye un estímulo único para inducir la cardioprotección. Otros enfoques estudiados incluyen el uso preventivo de agentes farmacológicos (Gross y Gross, 2007), para inducir resistencia a la lesión por IR, y el acondicionamiento isquémico (PCI) (Murry, 1986). De manera general, se ha demostrado que al igual que el ejercicio, los fármacos y el PCI proporcionan una protección de similar magnitud contra lesiones por IR (Bolli *et al.*, 2004; Gross y Gross, 2007; Murry, 1986), aunque los datos existentes sugieren que la cardioprotección mediada por cada uno de los mecanismos ya mencionados es fundamentalmente diferente.

El ejercicio al igual que el PCI produce respuestas protectoras bifásicas aproximadamente similares contra la IR. Una primera fase, producida en los primeros minutos a horas después del ejercicio o del PCI, desaparece con la misma rapidez. La segunda fase, con una ventana temporal más amplia de protección contra las lesiones por IR dura varios días. Sin embargo, durante la fase tardía, el ejercicio y el PCI revelan diferentes perfiles de protección puesto que la protección por PCI se pierde después de aproximadamente unas 96 horas mientras que la protección conferida por el ejercicio se mantiene durante 9 días (Lennon *et al.*, 2004; Bolli *et al.*, 2004).

La evidencia sugiere que el ejercicio constituye un estímulo cardioprotector más robusto al demostrar que el entrenamiento a corto plazo protege los corazones en edad avanzada (Quindry *et al.*, 2005; Quindry *et al.*, 2010; Starnes *et al.*, 2003), al contrario que el IPC y el acondicionamiento farmacológico que son ineficaces en la obtención de cardioprotección en los corazones senescentes (Schulman *et al.*, 2001).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la resistencia al IR inducida por el ejercicio es independiente de las alteraciones musculares o del flujo sanguíneo y se atribuye a adaptaciones bioquímicas específicas del miocardio derivadas del ejercicio (Quindry *et al.*, 2013).

Actualmente, muchas investigaciones están siendo dirigidas con el propósito de descubrir nuevas intervenciones terapéuticas eficaces contra la IR. Se considera que la realización regular de ejercicio representa una importante intervención de estilo de vida en la prevención y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y la lesión por IR. Así pues, la evidencia disponible muestra que el ejercicio aeróbico de intensidad moderada es también un modelo experimental importante para la comprensión de los mecanismos celulares de cardioprotección contra la lesión y se ha encontrado que el ejercicio aeróbico, continuo y a intervalos de alta intensidad, producen un fenotipo cardioprotector (French *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2008). Además, un estudio reciente sugiere que 12 semanas de entrenamiento de ejercicios de resistencia proporciona protección contra el infarto de miocardio inducido por IR en ratas (Doustar *et al.*, 2012).

Así mismo, otros autores han registrado una menor incidencia de muerte súbita de origen cardíaco en individuos con un nivel de actividad física regular mayor que en aquellos sujetos con un nivel de actividad física menor (Bartels *et al.*, 1997; citados por Orts, 2007). Ekelund *et al.*, (1998), encontraron una menor incidencia de muerte súbita en pacientes con un buen estado físico o con un gasto energético alto por las características de su esfuerzo físico. Por otro lado, en un estudio realizado en pacientes con historia previa de infarto de miocardio y que siguieron un programa de rehabilitación con ejercicio físico, se encontró una disminución significativa en la incidencia de muerte súbita (Berlin y Colditz, 1990).

Aunque diversos estudios han pretendido encontrar otros mecanismos por los cuales se provee al corazón de protección frente a la isquemia-reperfusión, lo cierto es que, hasta el momento la única herramienta terapéutica eficaz, segura, viable y con menos efectos adversos es la práctica regular de un programa de ejercicios. Esto lo sustentan los estudios epidemiológicos que demuestran que la práctica de ejercicio, de manera habitual, disminuye el riesgo de muerte por las lesiones causadas por isquemia-reperfusión en el miocardio.

Entre los mediadores potenciales del preconditionamiento derivado del ejercicio se incluyen las proteínas de choque térmico (HSP),  $\text{Ca}^{2+}$  proteínas de manipulación, los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  y los antioxidantes endógenos. Para resumir una gran cantidad de investigación reporta que la cardioprotección derivada de PCI es esencialmente dependiente del aumento de la actividad y del contenido de proteínas de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de la forma inducible de la óxido-nítrico-sintasa (iNOS) dentro del miocardio (Shinmura *et al.*, 2002). Quindry y Hamilton (2013), no encontraron niveles de iNOS ni de la COX-2 sobre expresados en los corazones de animales jóvenes ejercitados que exhibieron cardioprotección contra la IR global (Quindry *et al.*, 2005), lo que podría indicar que el ejercicio no sobreexpone este tipo de proteínas. Además, dado que los niveles de iNOS cardíacas aumentan con la edad y que es evidente la estrecha relación entre edad avanzada y la incidencia de enfermedades del corazón, se encontró que con unas pocas semanas de entrenamiento físico es posible invertir eficazmente dicha relación (Lawler *et al.*, 2009).

### ***1.2.3.1. Efectos del entrenamiento físico sobre las propiedades eléctricas del corazón***

Puesto que son diversos los autores que evidencian como el desarrollo de arritmias por reentrada está íntimamente relacionado con las alteraciones de las

propiedades eléctricas del corazón, es necesario conocer los efectos que ejerce la práctica del ejercicio físico crónico sobre propiedades tales como la refractariedad, la heterogeneidad, etc.

Para empezar, es necesario resaltar que la refractariedad miocárdica es una propiedad que junto con la velocidad de conducción determinan la longitud de onda del proceso de activación del miocardio, la que a su vez está relacionada con la aparición y estabilización de las arritmias por reentradas. De esta manera, es preciso ahondar más sobre como el ejercicio físico modifica la refractariedad miocárdica, lo que parece aumenta la estabilidad eléctrica cardiaca y ejerce protección contra la muerte súbita cardiaca producida frecuentemente por las arritmias por reentrada (Billman, 2002).

Such *et al.* (2002), empleando un modelo de corazón, aislado y perfundido, de conejo encontraron que el periodo refractario funcional del ventrículo izquierdo era un 20 % mayor en los animales entrenados respecto a los controles, aunque no se encontraron diferencias significativas en otros parámetros asociados a la refractariedad entre los animales entrenados y los no entrenados. Posteriores estudios corroboraron estos hallazgos en los que se demostró nuevamente que el entrenamiento físico crónico exhibía modificaciones de la refractariedad ventricular por la prolongación del periodo refractario efectivo ventricular y del periodo refractario funcional ventricular, al igual que la disminución de la frecuencia dominante de la FV. Esto se traduciría en que dichas modificaciones podrían ser un factor protector frente a las diversas perturbaciones eléctricas que desencadenan las arritmias como la FV (Such *et al.*, 2008). Se observó también una disminución en la FD de la FV conejos entrenados, lo que según opinión de algunos otros autores (Chorro *et al.*, 2000a) esta modificación representa el mismo significado electrofisiológico que la producida en el periodo refractario puesto que hay una relación inversa entre la FD de la FV y la refractariedad.

Con respecto a la heterogeneidad electrofisiológica se puede hacer alusión a otros trabajos de investigación que sugieren de manera indirecta que el entrenamiento disminuye la heterogeneidad. De este modo, en un estudio con corazones aislados de oveja a los que se les provocó FV, se encontró que el coeficiente de variación (CV) de la frecuencia dominante de la FV se correlacionaba directamente con la frecuencia dominante de la FV, de forma que a mayor frecuencia dominante mayor CV y por lo tanto ello evidenciaba mayor heterogeneidad. Diversos estudios, como el de Such *et al.* (2008) y Zarzozo *et al.* (2012), relataron una disminución de la frecuencia dominante de la FV en animales sometidos a un protocolo de entrenamiento igual al empleado en esta tesis. En otros trabajos de investigación se observó un efecto directo del ejercicio físico crónico sobre la heterogeneidad electrofisiológica (Hajnal *et al.*, 2005, Such-Miquel *et al.*, 2018).

Del mismo modo, en otros estudios con animales se encontró una menor incidencia de arritmias letales y una menor heterogeneidad electrofisiológica en corazones de perro sometidos a protocolos de ejercicio físico (Babai *et al.*, 2002), y un mantenimiento del coeficiente de variación de la frecuencia dominante de la FV en conejos entrenados mientras que en los controles aumentó.

Por consiguiente, es probable que el ejercicio físico crónico produzca una disminución en la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio, lo que coincide con diversas investigaciones reportadas por nuestro grupo de investigación (Parra *et al.*, 2010; Parra, 2012; Such *et al.*, 2018).

### ***1.2.3.2. Las modificaciones electrofisiológicas miocárdicas por el ejercicio físico crónico como mecanismo básico protector antiarrítmico***

En relación al efecto protector cardiovascular del ejercicio, en la actualidad se dispone de recopilaciones y revisiones amplias y completas que nos han servido de base para cumplimentar el presente apartado (Dor-Haim, 2013).

Muchos estudios epidemiológicos apoyan que el concepto de que el ejercicio regular se correlaciona con la reducción en la mortalidad, tanto total como de origen cardiovascular en individuos aparentemente saludables (Blair *et al.*, 1996; Manson *et al.*, 2002; Paffenbarger *et al.*, 1993; Sandvik *et al.*, 1993); y en pacientes con enfermedad cardiovascular (Myers *et al.*, 2002). Recientemente, Kokkinos *et al.* (2008), demostraron una inversa y graduada relación entre la capacidad de ejercicio y todas las causas de mortalidad en humanos. Mozzaffarian *et al.* (2008), mostraron además que actividades físicas de ligeras a moderadas están asociadas con una incidencia significativamente más baja de fibrilación auricular (FA) en adultos mayores. Estudios epidemiológicos también documentan que la actividad física regular reduce la incidencia de arritmias ventriculares (Berlin y Colditz, 1990), y de muerte súbita cardíaca (Bartels *et al.*, 1997).

El efecto protector del ejercicio fue también demostrado en modelos animales. Billman *et al.*, (1984), mostraron que el ejercicio diario previene la FV inducida por la isquemia miocárdica aguda en una subpoblación de perros que fueron identificados como susceptibles de padecer una muerte súbita cardíaca. Ellos también demostraron que el ejercicio alteró el tono autonómico a favor del parasimpático. Posel *et al.*, (1989), revelaron que el entrenamiento físico incrementa el umbral ventricular del corazón aislado de rata, previamente infartado antes y después del inicio del reinfarto. Este efecto fue atribuido nuevamente al tono autonómico alterado a favor de la rama parasimpática. Además, fue demostrado que

el entrenamiento físico acompañado por un cambio a través de la actividad vagal aumentada reduce la mortalidad en pacientes tras isquemia miocárdica (La Rovere *et al.*, 2002).

Según la revisión de Billman de 2009, los efectos que el entrenamiento físico de resistencia ejerce sobre las anomalías de la repolarización no han sido investigados ampliamente. Se ha demostrado que el acondicionamiento aeróbico reduce el intervalo QT en pacientes con síndrome de QT largo tipo 1 (Perhonen *et al.*, 2006) y en mujeres saludables jóvenes y en edad avanzada (Genovesi *et al.*, 2007; Schwartz y Zipes 2000).

Bonilla *et al.* (2012), en su estudio realizado en un modelo canino, analizaron los efectos de un periodo de entrenamiento físico o de sedentarismo, (durante 10 semanas), sobre las variables del ECG, en respuesta al ejercicio más isquemia, y encontraron por un lado que: el intervalo QT aumentó significativamente ( $p < 0,02$ ) durante la isquemia tanto en el grupo sedentario + FV, como en el grupo entrenado + FV, antes del inicio del periodo de 10 semanas de estudio. Por el contrario, el intervalo QT aumentó aún más durante la isquemia en el grupo sedentario + FV, pero no lo hizo en el grupo de perros entrenados + FV, al final del periodo de entrenamiento de 10 semanas. De manera similar, el *Tpeak+Tend* (índice de pico y final de la onda T), una medida de la dispersión de la repolarización, también aumentó durante la isquemia antes del inicio del período de estudio, tanto en el grupo sedentario como en el de ejercicio, pero solo en el grupo sedentario al final de las 10 semanas del período de entrenamiento ( $p < 0,0002$ ).

Así también, la isquemia miocárdica provocó un mayor incremento en el intervalo QT y en el *Tpeak-Tend* en perros sedentarios comparados con perros entrenados, que se había visto previamente eran susceptibles a sufrir una fibrilación ventricular (Billman, 2007). Datos preliminares (11 células obtenidas de 2 perros)

indican que la práctica de ejercicio también puede disminuir la DPA en animales susceptibles (en ese modelo canino, la susceptibilidad a la muerte súbita cardíaca fue definida como taquiarritmias ventriculares, flutter ventricular o fibrilación ventricular, que fueron inducidas por isquemia aguda miocárdica durante el ejercicio submáximo (Billman, 2006), a tal punto que ya no difieren de los animales sin infarto. Por último, la práctica de ejercicio aeróbico reduce la diferencia regional en la repolarización ventricular en pacientes con insuficiencia cardíaca (Ali *et al.*, 1999) e incrementa la refractariedad efectiva ventricular en conejos (Such L. *et al.*, 2008). Considerados en conjunto, estos datos sugieren que el entrenamiento de resistencia puede reducir las heterogeneidades inducidas por isquemia en la repolarización y con ello podría proteger contra la fibrilación ventricular.

#### **1.2.4. Implicación del canal $K_{ATP}$ en la fisiopatología de la isquemia miocárdica**

En las líneas siguientes relataremos en primer lugar unas generalidades acerca del canal de potasio ATP dependiente. A continuación, haremos referencia a los distintos trabajos de investigación en los que se atribuye un efecto protector al bloqueo de los canales  $K_{ATP}$  en el miocardio isquémico, para a continuación referirnos a aquellos trabajos de investigación que, por el contrario, atribuyen un efecto protector a la activación de los canales citados. Finalmente nos referiremos a los trabajos de investigación que postulan el bloqueo de los canales  $K_{ATP}$  (en un caso) o la apertura de los mismos (en otro caso) como los mecanismos básicos por los que el ejercicio físico crónico ejerce un efector protector en la oclusión coronaria aguda.

##### ***1.2.4.1. Generalidades del canal de potasio ATP-dependiente***

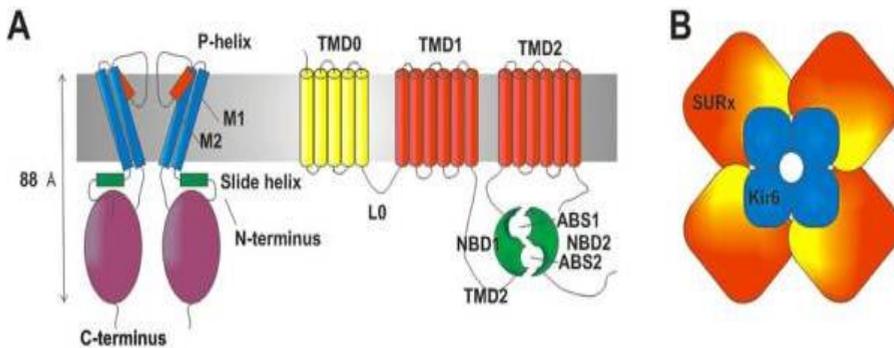
Los canales de potasio sensibles al ATP (canales  $K_{ATP}$ ), inicialmente descubiertos en corazón por Noma (1983), en parches de membrana aisladas

preparadas a partir de miocitos ventriculares de cobaya, fueron posteriormente identificados en otros tejidos incluyendo el cerebro, neuronas centrales (Ashcroft y Ashcroft, 1990), el músculo esquelético (Spruce *et al.*, 1985) y liso (Standen *et al.*, 1989), el epitelio renal y traqueal, el músculo liso del tracto urinario y el páncreas (Cook y Hales, 1984), en el cual actúan como moduladores de la liberación de insulina por las células pancreáticas beta (Kersten, *et al.*, 1998); entre otros.

Los canales  $K_{ATP}$ , deben su nombre a la regulación inhibitoria conferida por el ATP intracelular, por lo que un descenso en la concentración de este nucleótido favorece la activación del canal (Tamayo, 2007). En todas las células los canales  $K_{ATP}$  acoplan el estado metabólico celular con la actividad eléctrica de la membrana plasmática (Aguilar-Bryan y Bryan, 1999). Estos canales además de regular el potencial de reposo también modulan el potencial de acción, y esto puede desempeñar un importante papel en los procesos fisiológicos (Lara *et al.*, 1999).

En los miocitos cardíacos se ha propuesto que estos canales funcionan como un mecanismo de defensa celular, ya que se activan en condiciones de hipoxia e isquemia, causando una hiperpolarización de las células, disminuyendo su excitabilidad y reduciendo así sus demandas metabólicas (Ashcroft S.J. y Ashcroft F.M., 1990; tomado de Tamayo, 2007).

Los canales de  $K_{ATP}$  son hetero-octameros conformados por cuatro subunidades de canal de potasio rectificador interno del (Kir6.2) y por cuatro subunidades reguladoras del receptor de la sulfonilurea (SUR) (Inagaki *et al.*, 1995), y se encuentran en las membranas internas mitocondriales y sarcolemales.



**Figura 1.7. Base estructural de la actividad del canal K<sub>ATP</sub>.** (A) Los canales K<sub>ATP</sub> están formados por las subunidades Kir6 (izquierda) y SUR (derecha). El Kir6 está constituido por una estructura tetramérica de subunidades, cada una formada por dos hélices transmembrana (M1, M2), una región de formación de poros (que incluye la hélice -P y el poro de selectividad), el extremo N-citoplasmático (incluida la hélice deslizante anfipática) y el extremo C. El SUR está conformado por las regiones TMD0 y L0 que interactúan entre ellas y modulan la activación de Kir6, seguidas de dos regiones TM de 6 hélices adicionales, cada una seguida por un pliegue de unión a nucleótidos (NBD). Los dos pliegues de unión de nucleótidos se unen para generar dos sitios de interacción de nucleótidos en su interfaz. (B) El canal K<sub>ATP</sub> es una estructura octamérica de las subunidades Kir6 y SUR (tomado de Flagg *et al.*, 2010).

Los canales K<sub>ATP</sub> son inhibidos por el ATP<sub>i</sub> y activados por el MgADP, de modo que la actividad del canal es regulada por la proporción de ATP/ADP (Yellen, 2002). Diferentes factores desensibilizan los canales K<sub>ATP</sub>, incluyendo los nucleótidos difosfatos, el lactato, los radicales libres derivados del oxígeno y por estimulación del receptor A1 de la adenosina (Seino y Miki, 2003; Yokoshiki *et al.*, 1998).

Fue Noma, quien inicialmente formuló que la apertura de los canales de K<sub>ATP</sub> acorta la duración del potencial de acción cardiaco a través de la aceleración de la fase 3 de la repolarización. Una incrementada repolarización de la fase 3 podría inhibir la corriente de entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales tipo L y prevenir la sobrecarga celular de Ca<sup>2+</sup>. Además, el enlentecimiento de la despolarización podría también reducir la entrada de Ca y retardar o prevenir la reversión del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Esas acciones podrían incrementar la viabilidad celular por medio de una

reducción en la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la isquemia y la reperfusión temprana. Existe considerable apoyo experimental para el papel protector de los canales de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  del sarcolema en la función miocárdica (Halestrap, 2006; Cole *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 1993; Yao y Gross, 1994; Yao y Gross, 1994. Tomado de Golbidi y Laher, 2012).

En opinión de un gran número de autores, los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  sarcolemales son un blanco potencial para la protección, inducida por el ejercicio, contra la isquemia-reperfusión. Durante la isquemia, las células cardiacas recurren metabólicamente a la glucólisis anaerobia incrementada para compensar la reducción de ATP. La acidosis resultante incrementa el influjo de  $\text{Na}^+$  hacia el interior celular a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y se inhibe la  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPasa}$  sarcolemal dependiente de ATP, lo que aumenta la acumulación inicial de  $\text{Na}^+$  (Ladilov *et al.*, 1995; Piper *et al.*, 2004). La alta concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular provoca que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  trabaje en el modo reverso, produciendo una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica y mitocondrial tras la reperfusión, al tiempo que una ráfaga de radicales libres derivados del oxígeno es generada por las mitocondrias, mientras que la sobrecarga intracelular de  $\text{Na}^+$  continúa como resultado de la alteración de la función de  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPasa}$ .

#### ***1.2.4.2. Importancia de los canales de $\text{K}_{\text{ATP}}$ a nivel cardíaco***

El presente apartado ha sido objeto de amplias y minuciosas revisiones y que de modo sucinto expondremos a continuación (Tamargo *et al.*, 2004).

Los canales están cerrados a concentraciones normales de ATP. En presencia de bajos niveles de ATP ( $< 0,5$  mM), tal como sucede durante la isquemia la apertura de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  provoca una salida de potasio y la hiperpolarización de la célula (Jalife *et al.*, 2009), lo que disminuye la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los

canales tipo L y acorta la duración del potencial de acción. Estos efectos previenen la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , preservan los niveles de ATP e incrementan la supervivencia celular (Grover y Garlid, 2000; Gögelein, 2001).

La activación de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  juega un papel importante en el preconditionamiento isquémico (PCI), en el que breves períodos, individuales o múltiples, de isquemia miocárdica confieren protección contra una posterior isquemia prolongada, reduciendo el tamaño del infarto de miocardio, la gravedad del aturdimiento y la incidencia de arritmias cardíacas. Sin embargo, la activación de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  también dio lugar a un acortamiento de la duración del potencial de acción, a la acumulación de  $\text{K}^+$  extracelular, a la despolarización de la membrana y a una velocidad de conducción lenta, efectos que hacen que el corazón isquémico sea vulnerable a arritmias por reentrada (Evans *et al.*, 1996).

Se observó que los fármacos abridores del canal de potasio el pinacidil, cromakalim, rimakalim y nicorandil ejercen efectos cardioprotectores en modelos de isquemia/reperfusión en miocardio y en pacientes con infarto agudo de miocardio (Evans *et al.*, 1996, Grover y Garlid, 2000).

Sin embargo, estos fármacos también activan los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  en vasos (Kir6.1/SUR2B) y producen efectos hipotensores que limitan su uso en el tratamiento de la isquemia miocárdica. Además, ya que la densidad de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  es mayor en el epicardio, los KCOs producen un más marcado acortamiento de la duración del potencial de acción en células epicárdicas, conduciendo a una marcada dispersión de la repolarización y al desarrollo de actividad extrasistólica a través de un mecanismo de reentrada en la fase 2 (Di Diego y Antzelevitch, 1993). Sin embargo, los KCOS acortan la duración del potencial de acción (intervalo QT), reduce la dispersión transmural de la repolarización y suprime las tempranas y tardías postdespolarizaciones inducidas, en pacientes con LQT1.

Por otro lado, los canales  $K_{ATP}$  son bloqueados por las sulfonilureas (i.e. glibenclamida, glicazide, glipizida, glimepirida, tolbutamida), glinidas (repaglinida, nateglinida) y diversos fármacos antiarrítmicos (Carmeliet y Mubagwa, 1998; Liu *et al.*, 2001; Sakuta *et al.*, 1992; Sakuta *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995; Ripoll *et al.*, 1993). Los bloqueadores de los  $IK_{ATP}$  cardiacos previenen el acortamiento de la duración del potencial de acción y la incidencia de fibrilación ventricular durante la isquemia miocárdica, aun cuando en modelos de isquemia/reperfusión ellos son principalmente arritmogénicos (Evans *et al.*, 1996; Grover y Garlid, 2000).

Además, ya que los canales  $K_{ATP}$  están presentes en las células  $\beta$  pancreáticas y en el músculo liso (Seino y Miki, 2003), los bloqueadores del canal  $K_{ATP}$  pueden producir hipoglicemia y vasoconstricción coronaria, efectos que podrían descartar su interés como agente antiarrítmico. Los bloqueadores cardiosselectivos de los canales  $K_{ATP}$  (clamikalant, HMR 1098), inhiben el acortamiento de la duración del potencial de acción, inducido por hipoxia, y previenen la fibrilación ventricular, inducida por la oclusión de la arteria coronaria, en perros conscientes post-infartados, a dosis que no producen efectos sobre la liberación de insulina, la presión sanguínea o el flujo sanguíneo coronario (Grover y Garlid, 2000). Por lo tanto, estos canales podrían representar una aproximación al tratamiento de las arritmias ventriculares, en pacientes con enfermedad cardiaca coronaria.

#### ***1.2.4.3. Comportamiento del canal $K_{ATP}$ en la isquemia miocárdica***

Según Cole *et al.*, (1991), es sabido que la fase de meseta del potencial de acción cardíaco se reduce de manera marcada y las contracciones se disminuyen durante la depresión metabólica provocada por la isquemia, hipoxia, anoxia, o por tratamientos con venenos metabólicos (Carmeliet, 1978). Sin embargo, los

mecanismos responsables de estas alteraciones funcionales y su importancia para la supervivencia del miocardio durante la isquemia aún no se entienden completamente. La más rápida repolarización del potencial de acción podría deberse a: 1) una disminución de la corriente hacia el interior, 2) un aumento en la corriente hacia el exterior o 3) una combinación de ambos. Estudios de *voltaje clamp* insinúan que la alteración primaria en las corrientes de la membrana durante la intoxicación metabólica, la anoxia y la hipoxia es el desarrollo de una gran conductancia de salida de K, (Vleugels *et al.*, 1985; Noma y Shibasaki, 1985) resultante de la activación de canales de  $K_{ATP}$  independientes del tiempo, (Tanganuichi *et al.*, 1983; Fosset *et al.*, 1988; Stern *et al.*, 1988; Lederer *et al.*, 1989). Los canales de potasio sensibles a ATP se observaron inicialmente en parches de membrana extirpados expuestos a soluciones que carecían de ATP (Noma, 1983). Estos canales están cerrados a concentraciones intracelulares fisiológicas de ATP (5-10 mM), pero cuando la concentración se reduce su probabilidad de apertura incrementa (Noma, 1983; Kakei M. *et al.*, 1985). Estudios recientes proporcionan evidencia de que la  $IK_{(ATP)}$  también se activa por los llamados fármacos de apertura del canal de potasio, tales como nicorandil, cromakalim (Hiraoka y Fan, 1989; Sanguinetti, 1988 y pinacidil (Arena y Kass, 1989; Tseng y Hoffman, 1990). Por otra parte, la inhibición de los canales es proporcionada por sulfonilureas, antidiabéticos orales, como la glibenclamida y la tolbutamida (Fosset *et al.*, 1988). Los fármacos que actúan abriendo el canal de  $K^+$ , acortan el potencial de acción cardiaco notablemente y causan un inotropismo negativo (Mestre *et al.*, 1988; Osterrieder, 1988), que puede ser revertido con las sulfonilureas (Mestre *et al.*, 1988). Noma (1983), postula que la activación de la  $IK_{ATP}$  y un descenso en la duración potencial de acción podrían conducir a una preservación del ATP celular y a la prevención de la lesión isquémica irreversible.

Bajo condiciones metabólicas normales, los canales de  $K_{ATP}$  sarcolemales están predominantemente cerrados y ellos no contribuyen significativamente a la excitabilidad celular. Sin embargo, esos canales se abrirán

cuando sean expuestos a una gran cantidad de estrés metabólico tal como en la anoxia, en la inhibición metabólica o en la isquemia. Al acortarse el potencial de acción, la entrada de calcio se reduce y consecuentemente la contracción del miocito falla. Al reducirse la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , los almacenamientos de energía que podrían de otro modo ser utilizados en la contracción celular podrían ser preservados y la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  sería minimizada, protegiendo a la célula. Tal “estrategia” de preservación es por supuesto autolimitada, puesto que si demasiados miocitos paran de contraerse, el corazón para de bombear y el animal morirá, pero parece una idea razonable pero no comprobada de que la protección temporal de un pequeño número de células o de una región del corazón, contra el daño por sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la isquemia, es probable que opere en el corazón. Para apoyar la idea de que la activación de que el canal de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  es protector durante la isquemia, se ha demostrado que los fármacos abridores de los canales de potasio mejoran la preservación del ATP (McPherson, Pierce y Cole, 1993), y producen efectos anti-isquémicos por acortamiento del potencial de acción (Grover y Garlid, 2000).

Según Zhang *et al.* (2010), la evidencia disponible indica que la glibenclamida, un inhibidor selectivo del canal de  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , abole los efectos anti-isquémicos por inhibición del acortamiento del potencial de acción (Yao y Gross, 1993). En el ratón  $\text{Kir6.2}^{-/-}$ , los canales de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  sarcolemales están abolidos (Suzuki *et al.*, 2002) y los canales de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  están reducidos en densidad (Rainbow *et al.*, 2004), en miocitos cardiacos de ratas transfectada con un fragmento negativo dominante de SUR2A. En ambos de esos estudios, la cardioprotección isquémica es también abolida. En paralelo, la sobreexpresión moderada del SUR2A habría aumentado los canales de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  sarcolemales y protegido los corazones contra el estrés metabólico, incluyendo a la hipoxia y la isquemia/repercusión (Du Q., *et al.* 2006). La idea general de que la activación del  $\text{K}_{\text{ATP}}$  provee cardioprotección contra la isquemia es además apoyada por reciente evidencia que los ratones  $\text{Kir6.2}^{-/-}$  exhiben una respuesta alterada a la sobrecarga sistólica seguida de la constricción

aórtica transversa crónica (Hu X. *et al.*, 2008). Sin embargo, dos estudios más parecen contradecir un rol cardioprotector. En esos estudios, de grupos independientes, encontraron que ratones SUR1<sup>-/-</sup> y SUR2<sup>-/-</sup> fueron más tolerantes a la isquemia-reperusión global que los ratones control, con reducción del tamaño del infarto (Stoller *et al.*, 2007; Elrod *et al.*, 2008) Ya que los ratones SUR2<sup>-/-</sup> tiene una gran reducción de los canales de K<sub>ATP</sub> sarcolemales en el ventrículo, la cardioprotección aumentada es opuesta al fenotipo esperado (es decir, la protección está alterada). La cardioprotección en los ratones SUR2<sup>-/-</sup> concebiblemente podría ser debido a la pérdida del componente vascular SUR2B de los canales K<sub>ATP</sub>, pero una similar cardioprotección en los ratones SUR1<sup>-/-</sup> (Elrod *et al.*, 2008) podría no ser explicada por un mecanismo como este.

### **1.2.5. Efectos de la activación y bloqueo de los canales K<sub>ATP</sub> en la isquemia miocárdica. Efectos específicos de las actuaciones sobre el canal K<sub>ATP</sub> del sarcolema frente al canal K<sub>ATP</sub> mitocondrial**

La implicación del canal de potasio sensible a ATP en los efectos deletéreos de la isquemia miocárdica aguda ha sido objeto de controversias hasta la actualidad. Así si bien un importante número de autores considera la apertura de dichos canales, que se produce espontáneamente durante la isquemia miocárdica, como un efecto beneficioso, otros autores plantean el bloqueo de los mencionados canales, como una maniobra protectora frente a las arritmias por reentrada (como la fibrilación ventricular) en los momentos más prematuros del proceso isquémico en el miocardio.

En el presente apartado realizaremos una exposición sobre las dos posturas mencionadas, presentando las diversas investigaciones al respecto por los autores que ven como una ventaja a la apertura de los canales K<sub>ATP</sub> frente a los que la ventaja la atribuyen al bloqueo de los mismos.

Ha sido relatado por diversos autores (Powers *et al.*, 2008, citados por Quindry *et al.*, 2012) que numerosos mecanismos proporcionan la cardioprotección a través de la reducción del estrés oxidativo y el desacoplamiento energético experimentado durante la isquemia y reperfusión (IR). Relacionado tanto con el equilibrio redox miocárdico como con la disponibilidad de energía, los canales de potasio sensibles a ATP, mitocondriales ( $K_{ATP}$  mito) y sarcolemales ( $K_{ATP}$  sarco), han recibido una atención significativa como potentes mediadores protectores contra la lesión por IR, aunque, como señalan Boli y colaboradores (2004), citados por Quindry *et al.*, (2012), la activación sostenida de estos canales ha sido difícil de alcanzar.

Pese a que es importante para alargar la supervivencia y asimismo la funcionalidad del cardiomiocito, la activación del canal de  $K_{ATP}$  del sarcolema en la isquemia aguda, no es menos cierto que tal activación produce un acortamiento de la duración del potencial de acción y del periodo refractario, lo que sí se produce inhomogéneamente podrá promover la propia FV, ya que la heterogeneidad espaciotemporal es especialmente deletérea y arritmogénica (Janse y Wit, 1989), ya que estos efectos son claramente arritmogénicos, facilitando los fenómenos reentrantes. Además, cambios en la duración del potencial de acción inducidos por alteraciones en la salida del potasio pueden provocar anomalías de la conducción del impulso (Billman, 2008).

Son numerosas las investigaciones que han atribuido un efecto protector al bloqueo del canal  $K_{ATP}$  habiendo dado lugar a diversas revisiones al respecto (Billman, 2008).

Durante la isquemia miocárdica, un número de factores promueven disminución de la excitabilidad y fallos en la conducción, incluyendo: hipercalemia, acidosis y activación de la  $IK_{ATP}$  (Shaw and Rudy, 1997, tomado de Taylor *et al.*,

2012). Billman (2008), ha publicado que, según diversos estudios, la activación selectiva de los canales  $K_{ATP}$  conduce a la salida de potasio de las células isquémicas, al acortamiento de la duración del potencial de acción y a la dispersión de la refractariedad, lo que supone cambios electrofisiológicos que son responsables de la producción de arritmias ventriculares letales (Wilde, 1993; Bilman, 1994; Wilde y Aksnes, 1995). Por lo tanto, los fármacos que inhiben selectivamente estos canales, podrían ser particularmente efectivos en la prevención de la muerte súbita cardíaca. Asimismo, la sobreexpresión de canales es pro-arritmica y promueve la muerte prematura en ratones transgénicos.

Flagg *et al.* (2010), afirma que la hiperactividad del canal de  $K_{ATP}$  del sarcolema cardíaco disminuye la estabilidad eléctrica del corazón. Los cambios en la duración del potencial de acción inducido por alteraciones en la salida del potasio pueden también provocar anomalías en la conducción del impulso (Billman, 2008). Durante la isquemia, un número de factores promueven la depresión de la excitabilidad y la falla en la conducción, incluyendo la hipercalemia, la acidosis y la activación de la  $I_{KATP}$  (Shaw y Rudy, 1997, tomado de Taylor *et al.*, 2012). Es por tales razones, que el bloqueo de los canales citados debe ejercer un efecto protector frente a las arritmias asentadas sobre el fenómeno de la reentrada y que son causa de muerte súbita cardíaca. (Englert *et al.*, 2003).

Ha sido publicado, por diversos autores, un efecto protector frente a la fibrilación ventricular, derivado del bloqueo de los canales  $K_{ATP}$ , con el uso de bloqueantes del grupo de las sulfonilureas, en el modelo experimental de la rata (Lepran *et al.*, 1996; El Reyani *et al.*, 1999, tomado de Quindry *et al.* (2012).

Se ha demostrado que, el bloqueo del canal  $K_{ATP}$  durante la FV promueve la desfibrilación espontánea de corazones humanos, lo que también fue observado en animales por los investigadores que acabamos de citar, mediante la atenuación de la

dispersión espacio-temporal isquemiodependiente de la refractariedad al inicio de la FV, siendo probablemente la base molecular: la expresión heterogénea y alterada de las subunidades del canal  $K_{ATP}$  en corazones cardiomiopáticos (Farid *et al.*, 2011). Aunque ha sido publicado que el bloqueo de los canales de  $K_{ATP}$  puede agravar la lesión isquémica aguda, autores afirman que puede ser posible mantener un efecto antiarrítmico por bloqueo del canal de  $K_{ATP}$  sin consecuencias adversas para la cardioprotección mediante la selectividad de los canales de  $K_{ATP}$  del sarcolema, dejando intactos los canales de  $K_{ATP}$  mitocondriales (Farid *et al.*, 2011).

Esta última investigación, así como la que citaremos a continuación reviste especial importancia en la actual polémica acerca de la bondad o la poca idoneidad de bloquear los canales  $K_{ATP}$ . Taylor *et al.* (2012), en un modelo de corazón de perro, aislado, fibrilando y sometido a isquemia global, encontraron que el bloqueo de los canales  $K_{ATP}$  con glibenclamida protegió frente a la instauración de zonas de inexcitabilidad eléctrica cardíaca, a diferencia de lo que ocurrió con la activación de dicho canal, en cuyo caso se presentaron zonas de depresión de la actividad eléctrica y asistolia.

En contraposición a los muchos trabajos de investigación dirigidos a estudiar el efecto antiarrítmico que exhibe la inhibición farmacológica de los canales que vehiculan la  $I_{K_{ATP}}$ , para otros autores la activación de los canales  $K_{ATP}$  durante la isquemia es más bien cardioprotectora en modelos experimentales “in vivo”. Este efecto protector lo explican sobre la base de una reducción de la duración del potencial de acción y de la contracción miocárdica, lo cual mantiene mejor los depósitos de ATP que serían consumidos para el proceso contráctil. Efectivamente, en condiciones normales del metabolismo, los canales  $K_{ATP}$  del sarcolema están en su mayoría cerrados, y no contribuyen de manera significativa a la excitabilidad celular. Sin embargo, estos canales se abrirán cuando se expone la célula a un estrés metabólico grave, como la anoxia, la inhibición metabólica o la isquemia. Al

acortarse el potencial de acción por activación del canal  $K_{ATP}$  sarcolémico, la entrada de calcio se reduce, y en consecuencia se deprime el proceso contráctil (Lederer *et al.*, 1989, citado por Zhang *et al.*, 2010). Al reducir la entrada de  $Ca^{2+}$ , las reservas de energía que de otro modo serían utilizados por la célula, para la contracción, serían preservadas y la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  se reducirán al mínimo, protegiéndose así a la célula. Si bien es cierto, si muchos miocitos detienen la contracción, el corazón deja de bombear y el animal muere, pero parece una razonable, si no probada, idea que la protección temporal de un pequeño número de células, o de una región del corazón, contra los daños de la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  durante la isquemia, es probable que opere en el corazón.

McPherson *et al.*, (1993), usando una sustancia abridora del canal  $K_{ATP}$ , el pinacidil, en un modelo de isquemia global de ventrículo derecho de cobayas, encontraron que se redujo la duración del potencial de acción, se inhibió la depleción de los niveles celulares de ATP y fosfocreatina, lo que probablemente se hallara ligado a su efecto sobre la contractura isquémica y a un fallo prematuro contráctil. La relación entre los niveles de fosfato de alta energía y las alteraciones de la maquinaria contráctil ha sido publicada por diversos autores (Nichols C.G., *et al* 1990).

Otros autores encontraron un deterioro de la función contráctil en modelos de isquemia y reperfusión en corazones de ratón *in situ*, tras la administración de bloqueadores del canal  $K_{ATP}$ . El tamaño del infarto disminuyó, en relación a los corazones procedentes de ratones con deficiencia de la subunidad Kir6.2 del canal  $K_{ATP}$  (Suzuki *et al.*, 2002, citados por Flagg *et al.*, 2010). Además de la preservación del ATP, la activación de los canales  $K_{ATP}$  puede reducir la excesiva entrada de  $Ca^{2+}$  y sus destructivas secuelas, incluyendo las arritmias, la disfunción contráctil y la muerte celular (Bers, 2008, tomado de Flagg *et al.*, 2010).

La existencia también de canales de  $K_{ATP}$  mitocondriales y el papel del canal  $K_{ATP}$  mitocondrial *versus* el canal  $K_{ATP}$  del sarcolema no está claro en absoluto (Zang *et al.*, 2010). Si bien hace ya tiempo se planteó la hipótesis de que el canal  $K_{ATP}$  del sarcolema era responsable de la protección del miocardio isquémico en el caso del preconditionamiento, evidencias posteriores han sugerido que el canal de  $K_{ATP}$  mitocondrial (mito  $K_{ATP}$ ) puede ser el que medie la cardioprotección inducida por el preconditionamiento (Gross y Fryer, 1999).

Diversas observaciones científicas han llevado a un debate sobre las distintas funciones del canal  $K_{ATP}$  del sarcolema y de la mitocondria en la protección frente a la isquemia miocárdica. Así, Vajda *et al.* (2007), observaron que la inhibición del canal  $K_{ATP}$  del sarcolema redujo la incidencia de arritmias ventriculares letales y mejoró la supervivencia tanto durante la isquemia aguda del miocardio como en la reperfusión en ratas. Este efecto beneficioso se correlacionó con la prolongación de la repolarización. La inhibición del canal de  $K_{ATP}$  mitocondrial no mejoró la supervivencia ni redujo la aparición de isquemia y/o arritmias inducidas por reperfusión y no prolongó el intervalo QT. (Vajda *et al.*, 2007). Estos últimos autores compararon el efecto de la glibenclamida, que, como es sabido, es un inhibidor no selectivo de los canales  $K_{ATP}$ , frente a un inhibidor selectivo de los canales de  $K_{ATP}$  mitocondriales, el 5-HD, y frente a un inhibidor selectivo de los canales  $K_{ATP}$  sarcolémales, el HMR 1883. La glibenclamida y el HMR 1883 redujeron la FV irreversible inducida por isquemia y mejoraron la supervivencia durante la isquemia miocárdica y durante la reperfusión; también la incidencia de arritmias inducidas por reperfusión fue reducida por la glibenclamida y el HMR 1883. El 5-HD no influyó en la supervivencia y en la incidencia de arritmias ventriculares.

En corazones de rata aislados sometidos a 25 minutos de isquemia global y 30 minutos de reperfusión, la administración de un abridor, fundamentalmente, del canal  $K_{ATP}$  mitocondrial (el diazóxido), y de un abridor del canal  $K_{ATP}$  sarcolémico

y mitocondrial, el cromakalin, se observó que el primero exhibió menos efectos deletéreos de carácter electrofisiológico, desde el punto de vista de crear un sustrato para las arritmias reentrantes (i.e.: menor acortamiento en la duración del potencial de acción, de lo que lo hizo el abridor del canal sarcolémico), si bien ambos abridores produjeron efectos beneficiosos de carácter mecánico (i.e.: aumento del tiempo para la aparición de contractura) así como la mejora de la recuperación funcional post-isquémica. Inversamente el bloqueo de estos canales mitocondriales abolió los anteriores efectos. Estos experimentos mostraron que el diazóxido fue significativamente menos potente que el cromakalim en el aumento de corrientes de  $K^+$  del sarcolema y pérdida del mismo por el miocito, y en el aumento extracelular de este ión (Garlid *et al.*, 1997).

Gonca y Bozdogan (2010), realizaron un estudio con el fin de evaluar el efecto de la inhibición del canal  $K_{ATP}$  del sarcolema y contrariamente de la apertura del citado canal a nivel mitocondrial, en la isquemia y reperfusión miocárdica en ratas de géneros masculino y femenino. Estos autores concluyeron que el bloqueo selectivo del canal  $K_{ATP}$  del sarcolema y la apertura selectiva del canal  $K_{ATP}$  mitocondrial, ejerció efectos anti-arrítmicos protectores, así mismo fue protector antiarrítmico el uso simultáneo de un bloqueante selectivo del canal sarcolémico y un abridor no selectivo del canal sarcolémico y mitocondrial. Los resultados del presente estudio indicaron que tanto la activación del canal de  $K_{ATP}$  mitocondrial y la inhibición del canal de  $K_{ATP}$  del sarcolema ejercen una acción antiarrítmica

Pérez *et al.* (2011), en un modelo de corazón aislado de rata y con el fin de evaluar la participación de los canales mitocondriales en el efecto protector sobre el miocardio isquémico, de la inhibición del intercambiador  $Na^+/H^+$  con cariporide, hallaron un efecto beneficioso al aumentar la actividad de los canales  $K_{ATP}$  mitocondriales con el abridor específico diazóxido. Yang *et al.* (2009), atribuyeron

un efecto protector frente a la isquemia y reperfusión en el miocardio de rata, tanto a la apertura del canal  $K_{ATP}$  del sarcolema, como al mitocondrial.

### **1.2.6. Papel de los canales $K_{ATP}$ como posible mecanismo por el que el ejercicio físico ejerce su efecto protector antiarrítmico**

En la actualidad, se han desarrollado muchas intervenciones dirigidas a la protección miocárdica frente al daño producido por la isquemia y reperfusión miocárdicas. De entre tales maniobras, destaca la realización de ejercicio físico. A pesar de esto, los mecanismos y/o mediadores por los que el ejercicio físico es protector no se hallan totalmente dilucidados hasta el momento, así como tampoco el mecanismo exacto de su participación. De entre los mecanismos probablemente implicados (v. gr.: estatus de la defensa antioxidante, respuesta de las proteínas de choque térmico, “disregulación” de las proteínas reguladoras de los movimientos del calcio intracelular), se ha enfatizado a la posible acción sobre el canal de potasio ATP dependiente (para revisión ver Quindry *et al.*, 2011).

La implicación del canal de potasio sensible a ATP en los efectos beneficiosos del ejercicio físico ha sido objeto de controversias hasta la actualidad. Se ha planteado por diversos investigadores la participación, en las modificaciones por el ejercicio físico, del canal  $K_{ATP}$ , al que se le atribuye un papel de “diana” sobre la que actuar para combatir las arritmias letales, cuyo mecanismo básico es la re-entrada (para revisión ver Billman, 2008). Efectivamente, como hemos visto, la activación de la corriente de potasio  $I_{KATP}$  se acompaña de una marcada dispersión de la repolarización y de la refractariedad dentro del miocardio, siendo esta una condición básica sobre la que, como es clásicamente conocido, se desarrollan arritmias (Di Diego y Antzelevitch, 1993; Billman, 2008).

### ***1.2.6.1. ¿Bloquea el ejercicio físico crónico los canales $K_{ATP}$ , en el miocardio isquémico? Investigaciones que apoyan este mecanismo***

Jew y Moore (2001), usando la preparación de corazón aislado y perfundido de rata sometido a un protocolo de isquemia-reperfusión global, observaron un incremento significativo de la rigidez diastólica en el ventrículo izquierdo en los animales sedentarios, pero no en los entrenados. El bloqueo del canal  $K_{ATP}$  con glibenclamida durante la perfusión provocó una normalización en todos los índices de la función contráctil en el ventrículo izquierdo. El entrenamiento aumentó la sensibilidad del corazón a la glibenclamida ya que los valores de la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo se normalizaron tanto en los controles como en los entrenados, aunque más en este último grupo. Para estos autores el incremento de la sensibilidad a la glibenclamida en los corazones entrenados es un nuevo hallazgo que podría implicar un papel de los canales de potasio ATP-dependientes en la cardioprotección inducida por el ejercicio contra el daño por isquemia/reperfusión. Para estos autores, el entrenamiento tiene un efecto supresor respecto a la apertura del mencionado canal, o de modo similar que el entrenamiento aumenta la afinidad al bloqueo de estos canales con glibenclamida, que actúa tanto sobre los canales del sarcolema, como sobre los existentes en la pared mitocondrial. A partir de los datos mecánicos, los autores suponen que la normalización mecánica derivada de la normalización de la morfología del potencial de acción, podría explicar que los animales entrenados recuperaran su función contráctil prontamente tras la perfusión post-isquémica.

Jew y Moore (2002), usando la técnica del “*patch clam*” en células procedentes de miocardio de rata, y sometidas a un periodo de anoxia, encontraron que: en las células procedentes de animales entrenados hubo un porcentaje mucho menor de expresión de corriente  $IK_{ATP}$  (sensible al bloqueante glibenclamida) y el pico de densidad de corriente vehiculada por el canal  $K_{ATP}$  era significativamente

menor que en los controles. En opinión de estos autores, estas alteraciones en la  $I_{K_{ATP}}$  serían el reflejo del proceso que contribuye a la cardioprotección inducida por el entrenamiento. Embota

Las observaciones comentadas hasta el momento, parecen indicar que el ejercicio físico confiere cardioprotección al corazón contra el daño isquémico, probablemente al aumentar la sensibilidad del corazón al bloqueo de los canales  $K_{ATP}$ , y por ello, estos hallazgos han servido de base para plantear que los efectos electrofisiológicos beneficiosos del ejercicio físico crónico en el corazón isquémico, pueden relacionarse, al menos en parte, con un efecto bloqueante de la corriente que vehiculan los canales mencionados. En ello insistiremos con posterioridad.

### ***1.2.6.2. ¿Abre el ejercicio físico crónico los canales $K_{ATP}$ , en el miocardio isquémico? Investigaciones que apoyan este mecanismo***

Además de que el papel que los canales  $K_{ATP}$  de membrana celular, en la protección miocárdica permanece relativamente poco investigado hasta la fecha (Powers *et al.*, 2008), y pese a los comentarios realizados en los párrafos anteriores sobre la posibilidad de que el ejercicio físico crónico actuara bloqueando el canal  $K_{ATP}$  en la isquemia, existe un gran número de trabajos que apuntan en la dirección contraria, pese a que observaciones nuestras (Del Canto y *et al.*, 2012, Soler y *et al.*, 2015) y lo que entendemos que se desprende de las investigaciones de Jew y Moore (2001, 2002), parecen apuntar hacia una menor actividad del canal, e incluso a un efecto bloqueante del mismo por el ejercicio, como hemos dejado a entender anteriormente.

Brown *et al.* (2005), publicaron que el entrenamiento físico, contrariamente a lo que hemos relatado hasta ahora, aumenta la expresión de los

canales  $K_{ATP}$  de membrana. Otros autores también postulan, como uno de los mecanismos más claramente implicados en el efecto protector del ejercicio físico, la existencia de niveles elevados de canales  $K_{ATP}$  de membrana celular (Kong *et al.*, 2001, Gross *et al.*, 2003, Powers *et al.*, 2008); incluso algunos autores, usando un modelo de corazón aislado similar al que pretendemos utilizar nosotros, publicaron que la inhibición farmacológica de los canales  $K_{ATP}$  de membrana celular empeora los efectos beneficiosos del ejercicio físico, producidos por la isquemia-reperusión (Brown *et al.*, 2005).

Quindry *et al.* (2010), realizaron un estudio en ratas para analizar si los canales  $K_{ATP}$  mitocondriales y sarcolemales proveían una protección antiarrítmica en corazones ejercitados, contra la isquemia-reperusión. La inhibición de los canales  $K_{ATP}$  mitocondriales mitigó los efectos antiarrítmicos del ejercicio físico, mientras que ello no ocurrió con la inhibición del canal sarcolémico. Estos hallazgos sugieren que el canal de  $K_{ATP}$  mitocondrial proporciona la protección anti-arrítmica como parte de la cardioprotección contra la isquemia-reperusión mediada por el ejercicio. Quindry *et al.*, (2012), realizaron un estudio con el fin de investigar la implicación del canal  $K_{ATP}$  mitocondrial y sarcolémico en el efecto del entrenamiento físico sobre la muerte celular y la apoptosis post isquemia y reperusión en ratas, y aunque ninguno de los canales mencionados ejerció protección contra la apoptosis, cuando el canal  $K_{ATP}$  del sarcolema fue bloqueado, se redujo el efecto protector del ejercicio físico sobre la magnitud del miocardio infartado.

Trabajos más recientes implican claramente al canal  $K_{ATP}$  en los efectos beneficiosos del ejercicio físico regular y demuestran que el ejercicio ejerce una regulación positiva del canal  $K_{ATP}$ , que es reflejado por el contenido elevado de las subunidades del canal, por la densidad de corriente y la contribución del canal al

acortamiento de la duración del potencial de acción a altas frecuencias de activación (Wang y Fitts. 2018).

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

Dado que: 1. Se ha publicado que el ejercicio físico crónico ejerce efectos protectores frente al desencadenamiento de la fibrilación ventricular, que es la principal causa de muerte súbita cardiaca; 2. De entre los mecanismos básicos propuestos para explicar el efecto protector se ha planteado una mayor actividad de la corriente vehiculada por la apertura del canal de potasio sensible a ATP del sarcolema del cardiomiocito ventricular; 3. Ha sido relatado que la apertura del mencionado canal ejerce un efecto arritmogénico; 4. Este efecto contrasta con el efecto antiarrítmico del ejercicio físico crónico; y 5. Que observaciones previas realizadas por nuestro grupo parecen asemejar más bien el bloqueo, y no la apertura, del canal  $K_{ATP}$  a los efectos electrofisiológicos del entrenamiento físico; nos hemos propuesto investigar la similitud, o por el contrario, la discrepancia, entre los efectos, a nivel de algunos parámetros electrofisiológicos relacionados con la instauración de fibrilación ventricular, que produce el ejercicio físico crónico y el bloqueo del canal  $K_{ATP}$ . Estos parámetros los estudiaremos en un modelo de corazón aislado de conejo (no sometido por tanto a influencias nerviosas centrales ni humorales) en el que provocaremos isquemia regional aguda, procedente de un grupo de animales sometidos a un protocolo de ejercicio sobre tapiz rodante, de un grupo tratado con un bloqueante del canal  $K_{ATP}$  y de un grupo control. Con ello podremos, comparando los resultados entre grupos, contribuir a evidenciar, en su caso, efectos electrofisiológicos del ejercicio físico que no pueden explicarse a través del efecto activador de la corriente  $I_{K_{ATP}}$  (que es lo que sostiene la casi totalidad de autores), e incluso que, por el contrario, parecen más bien ligados al bloqueo de la mencionada corriente.

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

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

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

- Determinar en corazones aislados provenientes de conejos, de un grupo control, de un grupo sometido a un protocolo de entrenamiento físico y de un grupo de conejos cuyo corazón aislado será tratado con un bloqueante del canal  $K_{ATP}$  (glibenclamida); y sometidos a fibrilación ventricular, sin interrumpir la perfusión, normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda, las modificaciones electrofisiológicas sobre:
  1. La refractariedad ventricular.
  2. Las características espectrales de la fibrilación ventricular inducida.
  3. El mantenimiento de la arritmia.
  4. La reversibilidad de la fibrilación mediante choques eléctricos.
- Comparar, tras la aplicación de los correspondientes test estadísticos, los resultados de estos parámetros con los procedentes de un grupo control y con los procedentes de animales sometidos a un protocolo de entrenamiento físico.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIALES

#### 2.1.1. Animales de experimentación

##### 2.1.1.1. Modelo animal empleado

La utilización de modelos animales para el estudio de las enfermedades cardiovasculares ha contribuido sustancialmente al mejoramiento del conocimiento de sus fisiopatologías. En este sentido el conejo, y en particular el de raza Nueva Zelanda Blanco (*Oryctolagus cuniculus*) (Figura 1.1.A.), debido a sus especiales características: cuerpo cilíndrico de tamaño mediano que facilita su manipulación, orejas grandes para facilitar la administración de inyecciones endovenosas a través de la vena marginal, carácter dócil y temperamento ligeramente nervioso (Fuentes *et al.*, 2010), se ha consolidado como modelo en los laboratorios de investigación, para el estudio de enfermedades cardiovasculares, en relación a la investigación de la isquemia miocárdica y la remodelación cardíaca (Verdouw *et al.*, 1998).

La razón principal para esta elección radica en que, el corazón de conejo (Figura 1.1.B.), es muy similar en ciertos aspectos al corazón humano (Panfilov, 2006; Gao *et al.*, 2007; Gaustad *et al.*, 2010; citados por Zarzoso (2011) y Parra, (2012)), ya que presenta escasa circulación coronaria colateral en condiciones fisiológicas (Maxwell *et al.*, 1987; Coker, 1989) y bajos niveles de xantino oxidasa (Downey *et al.*, 1987). Por esto, se ha sugerido que el corazón de conejo, que tiene bajo flujo colateral (Maxwell *et al.*, 1987), sea un buen modelo experimental para el estudio del infarto “sin tiempo”, es decir el infarto no precedido por angina previa

sea un buen modelo experimental para el estudio de la isquemia (Riccitelli *et al.*, 1991).

Así mismo, en un estudio histopatológico de la evolución del infarto de miocardio experimental sin reperfusión, en el conejo, Morales *et al.* (2001), observaron su similitud con la del humano, aunque con algunas diferencias (la hemorragia masiva intramiocárdica y la presencia de bandas de contracción), lo que convierte al modelo en una referencia para estudios posteriores vinculados a la isquemia y al infarto de miocardio.

Por otro lado, se sabe que, al emplear un protocolo de ejercicio físico con una intensidad, frecuencia y duración determinada, el conejo exhibe fácilmente signos cardiovasculares de los efectos del entrenamiento físico (DiCarlo & Bishop, 1990; Such *et al.*, 2002; Such *et al.*, 2008; citados por Zarzoso, 2011).

Y finalmente, y no menos importante, otros aspectos que se han tenido en cuenta respecto a la elección de la especie (Fuentes *et al.*, 2010) son:

- Fácil reproducibilidad experimental.
- Fácil cuidado y manejo del animal, además de bajos costes.



**Figura 2.1.** A: Conejo de raza Nueva Zelanda Blanco. B: Corazón aislado de conejo.

### ***2.1.2.2. Número de animales empleados para el estudio***

Para este estudio se emplearon 53 conejos machos de la raza Nueva Zelanda Blanco, que fueron provistos por el centro de cría y suministro oficial “Granja Cunicular San Bernardo S.L.” (Navarra, España). Cada uno de los animales que participaron, al inicio del estudio, tenían un peso corporal de 2037,4 ( $\pm$  173) g, y 9 semanas de nacidos.

### **2.1.2. Reactivos, fármacos y otros compuestos**

Los reactivos, fármacos y demás compuestos utilizados en las diferentes fases de la preparación experimental, para el estudio con corazones aislados de conejo, fueron los siguientes:

#### ***2.1.2.1. Para la fase de heparinización y anestesia del animal***

- Iodopovidona al 10 % (Betamadrileño, S.L.).
- Heparina sódica al 5 % de Rovi®.
- Ketamina (Ketolar® de PARKE DAVIS, S.L. Grupo Pfizer, S.A.).

#### ***2.1.2.2. Para la fase de perfusión***

##### **Solución Tyrode para la nutrición**

Los reactivos empleados en la elaboración de la solución Tyrode, fueron provistos por Sigma-Aldrich Química® y Panreac®. Esta solución, preparada en base a agua filtrada tipo II, fue perfundida a través de un sistema de Langendorff, y oxigenada con una mezcla del 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>; y cuya composición fue la siguiente:

- NaCl 130 mM.

- $\text{NaHCO}_3$  24,2 mM.
- $\text{KCl}$  4,7 mM.
- $\text{CaCl}_2$  2,2 mM.
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM.
- $\text{MgCl}_2$  0,6 mM.
- Glucosa 12 mM.

- **Solución para el bloqueo de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$**

- Se preparó una disolución del fármaco bloqueador de los canales de K dependientes de ATP (glibenclamida (Gb) 1 Mm), disuelta en 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) más Tyrode (figura 2.2.). Se eligió preparar la disolución a esta concentración para que al llegar al tejido cardíaco fuera de 10  $\mu\text{M}$  (10 veces menos concentrada). Para lograrlo medimos el flujo coronario de cada corazón, y a través de una bomba de jeringa para anestesia se infunde al sistema de perfusión Langendorff, con un flujo 100 veces menor al flujo del Tyrode.

### 2.1.3. Fungibles

Como se observa en la Figura 2.2., para este estudio, se han empleado distintos materiales fungibles para la preparación y administración de algunas de las soluciones:

- Filtros de papel Whatman de 1,2  $\mu\text{m}$ ; 7 bar max.
- Jeringa de 5 ml para heparinización y anestesia.
- Jeringa de 50 ml para infusión de glibenclamida+DMSO.
- Puntas para micropipetas Eppendorf (100 – 1000  $\mu\text{l}$ ).



**Figura 2.2.** Arriba izquierda: caja de puntas para micropipetas. Arriba derecha: DMSO. Abajo Izquierda: filtros Whatman. Centro: jeringas de 50ml. Abajo derecha: micropipeta Eppendorf.

## 2.1.4. Equipos

### 2.1.4.1. Equipamiento para la preparación de soluciones

- Micropipeta manual Eppendorf (Figura 2.2.), de volumen variable (100 – 1000  $\mu$ l). Empleada para la preparación de la solución de glibenclamida+DMSO.
- Balanza de precisión, para la medición de los solutos.
- Sistema de purificación de agua Merck Millipore®: con este sistema se obtuvo el agua filtrada tipo II, necesaria para la preparación de las soluciones empleadas durante el experimento.
- Termómetro de mercurio.

### 2.1.4.2. Equipamiento para el protocolo de entrenamiento

- Balanza de mesa digital.
- Libreta de registro con anotaciones sobre el peso (en g) del animal, descripción del estado aparente, y desempeño físico en cada una de las sesiones del entrenamiento (en el caso de los conejos entrenados).
- Cronómetro.
- Sistema de tapiz rodante LE8700 de Panlab-Harvard Apparatus: como se muestra en la Figura 2.3.A., y en la Figura 2.3.B., está compuesto por un tapiz rodante y el sistema de control del tapiz que permite variar la velocidad del mismo hasta alcanzar los 150 cm/s y elegir la inclinación de -25 a 25 °C. Adicionalmente, este sistema cuenta con una rejilla metálica en uno de los extremos del tapiz, que permite generar una ligera descarga eléctrica al animal, a través de la piel de sus patas, cuando se detiene al final del tapiz rodante. durante la sesión de entrenamiento. La intensidad de la corriente con la que el conejo es estimulado a través de la rejilla es constante y puede ir de 0 a 2 mA, lo que la hace totalmente inocua, pero a la vez útil como herramienta de estimulación para provocar que el animal corra nuevamente a través de la cinta.



Figura 2.3.A. Sistema de control del tapiz.

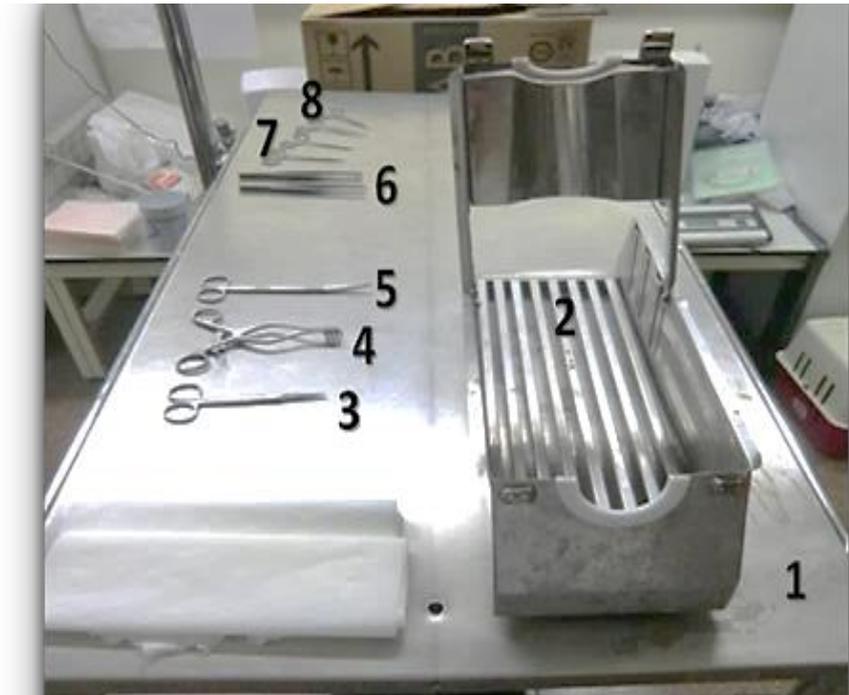


*Figura 2.3.B.* Tapiz rodante.

#### ***2.1.4.3. Equipamiento para el aislamiento del corazón***

Tal como se muestra en la Figura 2.4., y Figura 2.5., se emplearon los siguientes instrumentos para el procedimiento quirúrgico:

1. Mesa de operaciones.
2. Rack para anestesia de animales de mediano tamaño.
3. Tijera mayo recta.
4. Separador medioexternal (retractor automático Weitlaner).
5. Tijera Mayo curva.
6. 2 pinzas de disección simple.
7. 2 pinzas mosquito rectas.
8. 2 pinzas mosquito curvas.
9. Tijeras pequeñas.
10. Porta agujas de Heger.
11. Hilo de suturas y aguja quirúrgica.
12. *Beaker* de 500 ml, con solución de Tyrode (1 - 5 °C).



*Figura 2.4.* Material quirúrgico y rack de inmovilización para anestesia.



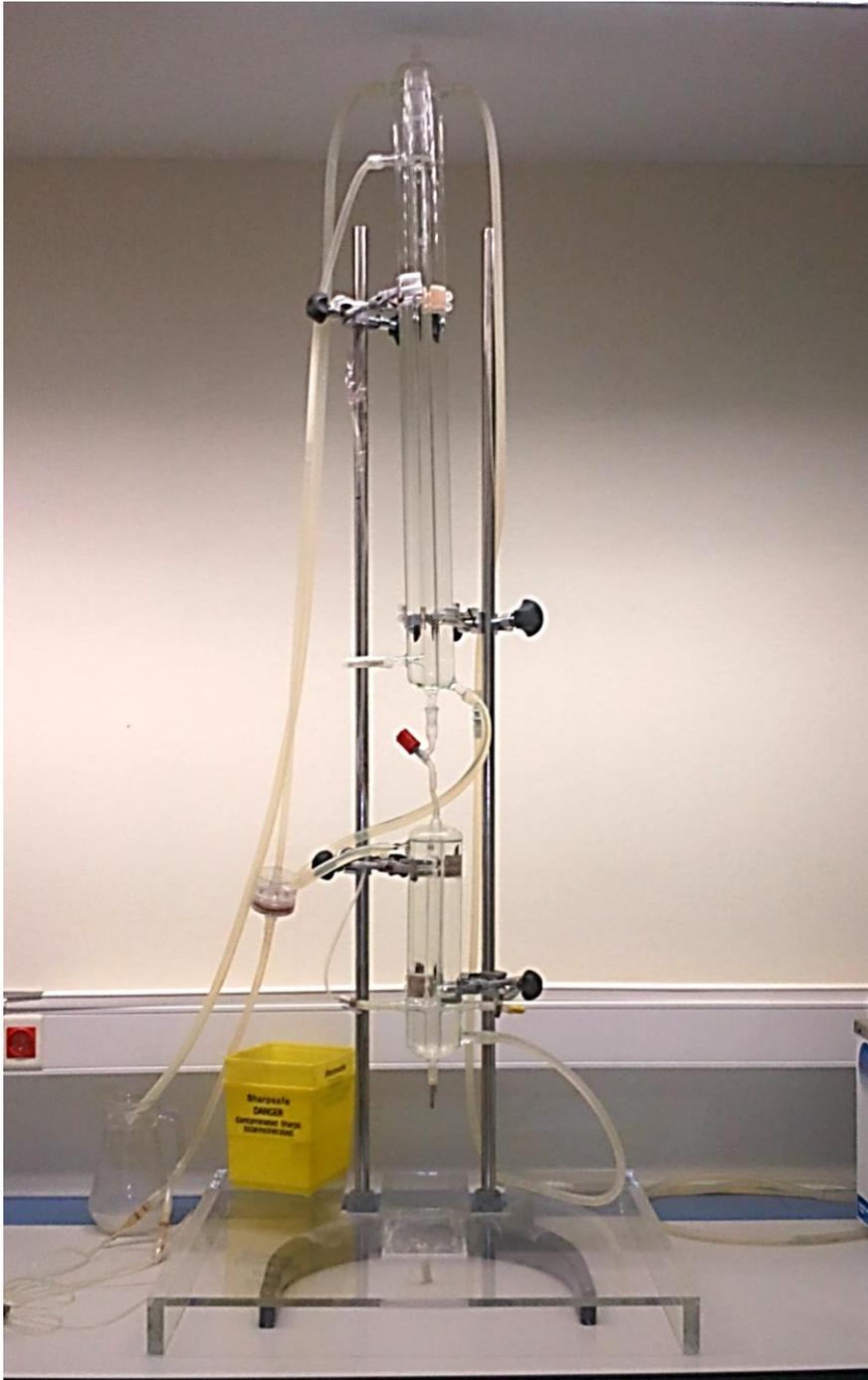
*Figura 2.5.* Detalle del material quirúrgico y beaker con solución Tyrode a 4 °C.

#### ***2.1.4.4. Equipamiento para estudio electrofisiológico: Sistema de Langendorff***

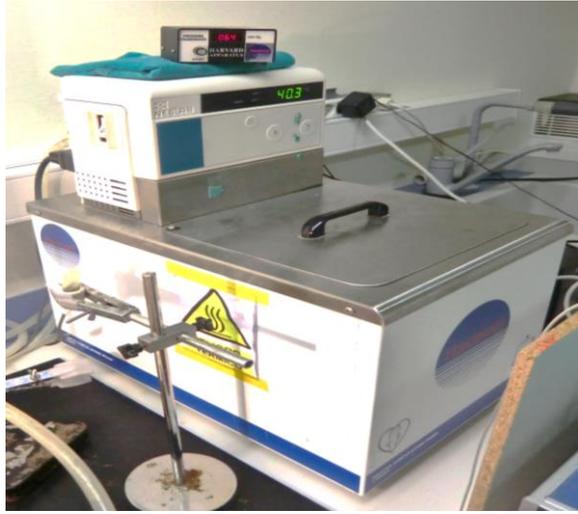
La implementación de un sistema Langendorff es la base para desarrollar la parte experimental de este estudio. Como se observa en la Figura 2.16., este sistema consta de dos partes: por un lado, un sistema de perfusión, y por otro, un sistema de instrumentación y monitorización de parámetros.

La primera parte, el sistema de perfusión Langendorff (Figura 2.6.), consiste en una serie de elementos que, al trabajar en conjunto, permiten mantener la óptima perfusión de un órgano, de manera aislada. En este estudio, este sistema se emplea para mantener perfundido el corazón aislado de conejo, mientras se registra su actividad eléctrica sobre la pared epicárdica. Así pues, este sistema se conecta al corazón, a modo de perfusión retrógrada, a través de la aorta ascendente, permitiendo así que las arterias coronarias puedan ser perfundidas con el oxígeno y los nutrientes necesarios para mantener el adecuado funcionamiento y la viabilidad del órgano.

Básicamente este sistema ha sido diseñado a partir de dos condensadores Liebig, conectados en serie, uno tras otro. El condensador Liebig está formado por dos tubos cilíndricos concéntricos (columna de doble camisa) hechos en vidrio borosilicato. Esta columna de doble camisa cuenta con un sistema de calefacción el cual, a través de un baño termostático con bomba de circulación (Figura 2.7.), calienta a 40 °C el flujo de agua destilada haciendo que recircule constantemente por el cilindro exterior. De esta manera, el cilindro exterior actúa como un intercambiador de calor, permitiendo calentar por convección el líquido que circula a lo largo del cilindro interior, en este caso la solución de Tyrode.



*Figura 2.6.* Columnas de vidrio, de doble camisa, del sistema de perfusión Langendorff.



*Figura 2.7.* Baño termostático con bomba de recirculación.

Durante la preparación de Langendorff, a parte, en un botellón de vidrio, el Tyrode es oxigenado mediante carbógeno y ajustado su pH (Figura 2.8.).



*Figura 2.8.* Al fondo de la imagen: botellón con Tyrode. Adelante: bomba peristáltica bombeando el Tyrode al sistema de perfusión.

A partir de ahí, esta solución es filtrada a través de una membrana de 5 micras, e infundida a través de una bomba peristáltica (Figura 2.8.), hacia la parte más elevada del cilindro interno del primer condensador (Figura 2.6.). Desde ahí, la solución pasa al segundo condensador, igualmente a través de su cilindro interno. Al este último estar en contacto con el agua filtrada que recircula a una temperatura de  $\sim 39\text{ }^{\circ}\text{C}$ , su pared de vidrio se calienta, y posteriormente este calor pasa por convección al Tyrode, llegando a calentarlo hasta aproximadamente los  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  necesarios para ajustarse adecuadamente al metabolismo del tejido cardiaco. De hecho, al finalizar el recorrido por el interior del condensador, el Tyrode finalmente es infundido al corazón, a través de una cánula de perfusión que está conectada a la aorta, como se muestra en la Figura 2.9.



**Figura 2 9.** Corazón de conejo conectado a la cánula de perfusión del Sistema de Langendorff.

De esta manera el corazón puede ser perfundido de forma retrógrada, al producirse el cierre de las válvulas, y así permitir la circulación del Tyrode por las arterias coronarias, que irrigan el músculo cardiaco. La presión de perfusión es controlada de manera manual, con un dispositivo de fabricación artesanal, el cual mediante una columna de líquido indica la presión con la que el Tyrode sale del sistema.

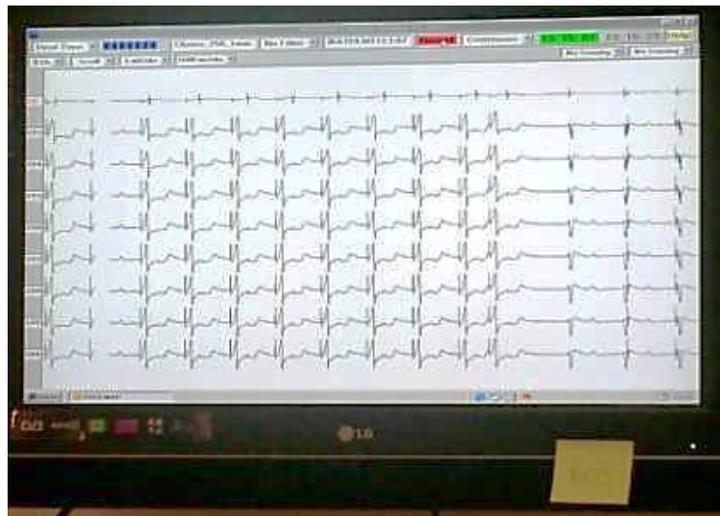
Además de todo lo anterior, para permitir la administración simultánea de fármacos junto con el Tyrode, se dispuso de una línea de infusión colateral que conectaba con la cánula de perfusión. En este estudio, a través de esta línea de infusión, y empleando una bomba de jeringa para anestesia (Figura 2.10.), se administró a uno de los grupos de corazones, una solución de glibenclamida + DMSO (1 mM).



*Figura 2.10.* Bomba de jeringa para anestesia P4000 IVAC.

Finalmente, es necesario recordar que no solo el sistema de perfusión es importante. También lo es el sistema de instrumentación y monitorización de parámetros, Este sistema permite registrar la actividad eléctrica del corazón, mientras este está siendo perfundido de manera artificial. Dicho sistema está compuesto por diferentes dispositivos electrónicos que, en conjunto, permiten el sensado y el procesamiento de la información proveniente de la señal eléctrica del músculo cardiaco. Los dispositivos empleados en este sistema se describen a continuación:

- **Ordenador de mesa:** dispositivo equipado con un sistema operativo MS-DOS.
- **Televisor LG®:** televisor de plasma, de 32 pulgadas. Funciona con el ordenador, con el modo de pantalla compartida. Permite observar a gran escala, en vivo y en directo, lo que ocurre con la señal epicárdica, como se observa en Figura 2.11.



*Figura 2.11.* Grabación del registro electrocardiográfico durante el experimento.

- **Estimulador de pulso cuadrado de salida dual GRASS S88R (Grass Instruments® Inc., Quincy, M.A., EE.UU.):** este sistema es capaz de emitir impulsos eléctricos de variable voltaje e intensidad, que permiten alterar y controlar de manera directa la frecuencia de latido del corazón en estudio. El sistema de estimulación está provisto de electrodos bipolares de acero inoxidable, con un diámetro de 0,125 mm y una distancia interelectrodo de 1 mm, que permiten la estimulación eléctrica

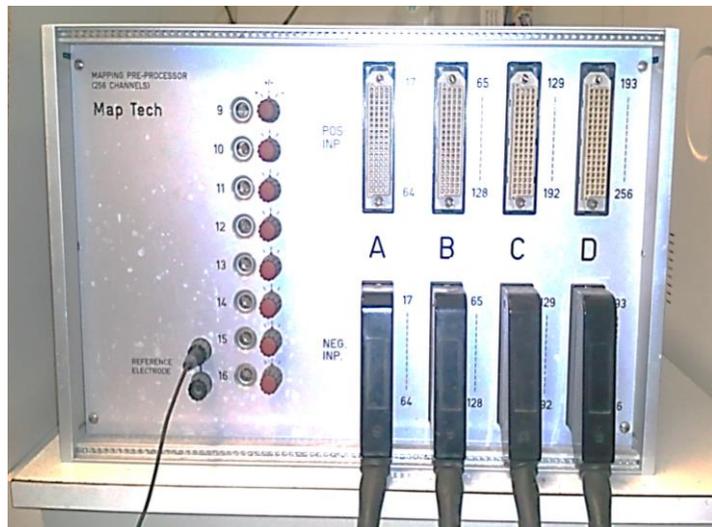
del corazón aislado, tanto a nivel auricular como a nivel ventricular (Figura 2.14.B.). Adicionalmente, el estimulador permite ajustar los parámetros para entregar pulsos únicos, repetitivos y trenes de pulsos idénticos; y es posible programarlos por medio de un sistema de computación conectado directamente con el estimulador GRASS S88R.



*Figura 2.12.* Estimulador GRASS S88R (abajo), con unidad de aislamiento de estímulos SIU5 (arriba).

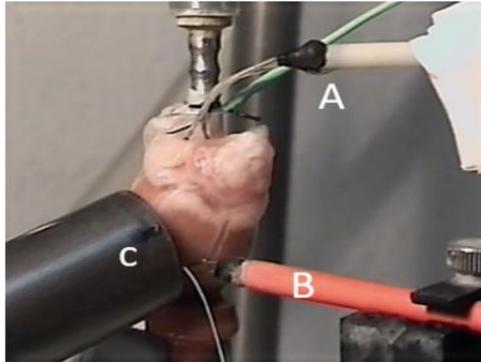
- **Unidad de aislamiento de estímulos eléctricos SIU5:** como se observa en la Figura 2.12., es un circuito transistorizado, ópticamente acoplado, diseñado para conectarse en serie a la salida del estimulador. Esta unidad solo es para uso en animales, nunca debe usarse en humanos.

- **Sistema de cartografía de la actividad eléctrica epicárdica MapTech® (Waalre, Holanda):** permite la adquisición, digitalización y el procesado de las señales electrográficas (electrogramas) ventriculares. Este sistema (Figura 2.13.) tiene una frecuencia de muestreo en cada canal de 1 Khz, con una resolución de 12 bits. Además, permite el multiplexado de los electrogramas, al combinar dos o más señales, provenientes de diferentes canales, que luego son enviadas a través de un solo medio de transmisión. Estas señales (electrogramas), fueron amplificadas con una ganancia de 100 - 300, y posteriormente se les aplicó un filtro pasa-banda de 1 - 400 Hz. Finalmente, los electrogramas obtenidos en los diferentes experimentos fueron almacenados en un soporte digital, preparado para la adquisición y registro de la actividad eléctrica cardiaca, con el propósito de analizarlos detenidamente *a posteriori*.



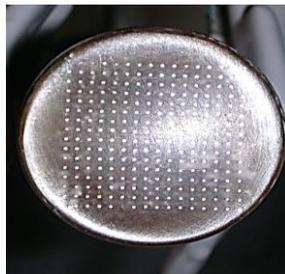
**Figura 2.13.** Sistema de cartografía MapTech®.

- **Electrodo de registro bipolar:** tal como se observa en la Figura 2.14.A., este tipo de electrodo se emplea para el registro del auriculograma. Está realizado en plata, con un diámetro de 0,5 mm y una separación interelectrodo de 1 mm.



*Figura 2.14.* A. Electrodo de registro bipolar auricular. B. Electrodo de estimulación ventricular. C. Electrodo de registro de múltiple canal.

- **Electrodo de registro de múltiple canal:** se emplea para el registro de los electrogramas de la pared ventricular (ventriculogramas), como puede observarse en la Figura 2.14.C. Está compuesto por una serie de 256 electrodos unipolares, de acero inoxidable, con un diámetro de 0,125 mm y una distancia interelectrodo de 1 mm como se observa en la Figura 2.15.



*Figura 2.15.* Detalle del electrodo de registro multicanal, con sus 256 electrodos unipolares.

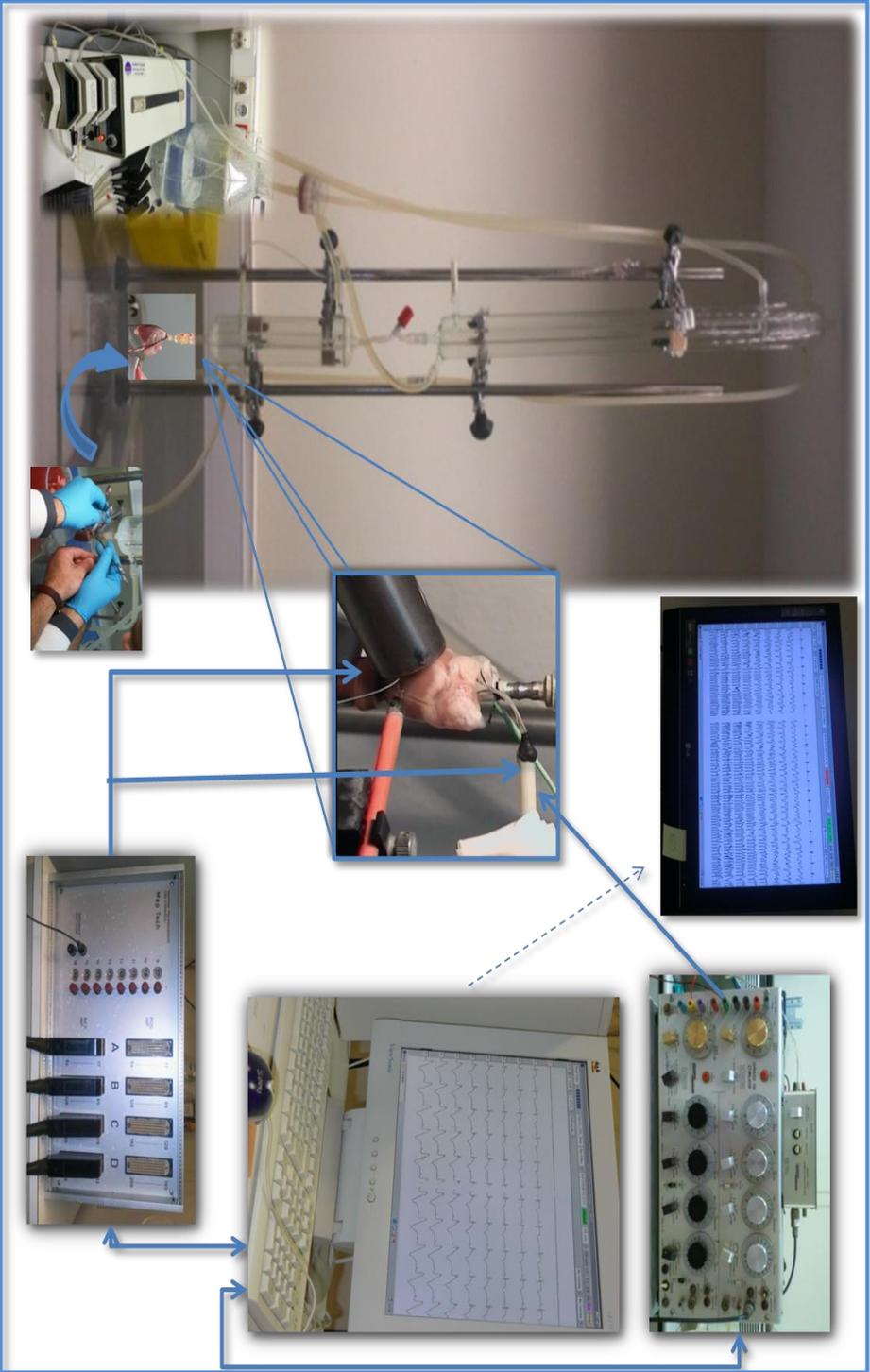


Figura 2.16. Preparación de Langendorff, con los sistemas de perfusión y de registro.

#### 2.1.4.5. Equipamiento para revertir la fibrilación

El desfibrilador *ad hoc* (Figura 2.17.), diseñado gracias a un proyecto de colaboración con el Grupo de Bioingeniería del Instituto ITACA (BioITACA), de la Universidad Politécnica de Valencia, se compone de una unidad de control y dos palas de desfibrilación. La unidad de control está provista de una pantalla LCD en el frontal, que muestra el nivel de energía suministrada por el equipo, a través de las palas de desfibrilación, la cual puede variar de 0,05 a 2,99 J y con un intervalo de incremento de 0,01 J. El control de la energía transferida se realiza automáticamente por medio de un microcontrolador que ajusta el tiempo de descarga del condensador para una diferencia de potencial fija de 100 V. Este equipo emite descargas de energía de onda bifásica, que son mucho más efectivas que las monofásicas al requerir aproximadamente la mitad de energía para desfibrilar. Por otro lado, las palas de desfibrilación están compuestas cada una, en su extremo distal, por una pequeña placa metálica circular, de 20 mm de diámetro y superficie semicóncava para facilitar un mejor acople de estas a la pared del epicardio.



Figura 2.17. Desfibrilador *ad hoc*.

### 2.1.5. Hardware y software empleado

Para el adecuado procesamiento digital de las señales electrográficas, tanto durante la fase experimental como en la fase de análisis de la señal, se empleó un ordenador personal, con sistema operativo MS-DOS, en el que se instalaron los siguientes softwares:

- **Paquete de procesamiento y registro Pacemap®:** software de la versión del año 2002, del sistema de mapeo cardíaco MapTech. Funciona bajo sistema operativo MS-DOS en un ordenador personal de requerimientos mínimos. Realiza funciones de configuración de la adquisición, permitiendo el cambio de ganancia, frecuencia de muestreo, control de la grabación, etc. Con el objeto de que puedan ser analizados fácilmente, los electrogramas se almacenan directamente en el disco duro del ordenador. Además, en esta versión la extracción de los episodios significativos constituye una tarea mucho más sencilla y rápida. Este software es el sistema convencional de mapeo cardíaco empleado por el Grupo de investigación en Electrofisiología Cardíaca, GRELCA, de la Universidad de Valencia.
- **MATLAB® 7.6.0.:** es un lenguaje de alto nivel y un entorno interactivo para el cálculo numérico, la visualización y la programación. Mediante MATLAB, es posible analizar datos y se puede utilizar en una gran variedad de aplicaciones, tales como procesamiento de señales, procesamiento de imagen, sistemas de control, pruebas y medidas. Sobre este lenguaje se han desarrollado diversas aplicaciones para el tratamiento de datos de interés en este estudio.

- **MedMap 2.1.:** Es un potente analizador multicanal, desarrollado en el entorno MATLAB<sup>®</sup>, por el Grupo de Bioingeniería del Departamento de Ingeniería Electrónica de Universidad Politécnica de Valencia para la investigación de los procesos fibrilatorios mediante el análisis de la evolución de la frecuencia dominante en el tiempo y para el cual emplea los registros de electrogramas unipolares provenientes de la pared epicárdica del corazón en estudio.
- **Microsoft Excel (Excel):** es un programa de hojas de cálculo desarrollado por Microsoft. Es utilizado para el tratamiento de las bases de datos provenientes de los diferentes registros del estudio. Aunque no se trata de un paquete estadístico dispone de funciones y macros para análisis sencillos, además que permite organizar y mostrar los datos según interés, a la vez que facilita el traslado de los mismos a otros paquetes estadísticos.
- **IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics 19:** es un sistema global para el análisis de datos. El SPSS Statistics puede adquirir datos de casi cualquier tipo de archivo y utilizarlos para generar informes tabulares, gráficos y diagramas de distribuciones y tendencias, estadísticos descriptivos y análisis estadísticos complejos.

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Protocolo de mantenimiento de los conejos

El grupo de conejos empleados en este estudio, fueron mantenidos y supervisados en el animalario de la Unidad Central de Investigación Médica (UCIM), perteneciente a la Fundación de Investigación Hospital Clínico Universitario de Valencia (FIHCUV – INCLIVA). Estos fueron alojados de manera individual, en un rack de jaulas ventiladas de acero inoxidable adecuadas a su especie, que permitían tanto la manipulación y la vigilancia del conejo como la limpieza diaria del lecho. Estos racks, como se observa en la Figura 2.18., estaban ubicados en un cuarto aislado del de otras especies, a una temperatura aproximada de 21 - 23 °C, sin alta humedad (31 % de humedad relativa), sin flujo directo de aire, pero adecuadamente ventilados; y con un fotoperiodo de luz artificial de 12 horas (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Los animales fueron alimentados *ad libitum* diariamente con agua y pienso estándar (Harlan Teklad Global Rabbit Diet) y con dos piezas de fruta (150 g de manzana) a la semana.



**Figura 2.18.** Racks para estabulación de los conejos.

### 2.2.2. Protocolo de supervisión de los animales

Los conejos fueron supervisados desde el primer día en que llegaron a la UCIM, hasta el día del sacrificio, es decir durante las 8 semanas que aproximadamente permanecían estabulados en el animalario.

Tanto el cuidado, el seguimiento del estado general de los animales, el control de peso diario, así como también el desarrollo del protocolo de entrenamiento físico, fueron realizados por personal debidamente cualificado, y llevado a cabo dentro del animalario de la UCIM, en un quirófano adaptado, y equipado con los instrumentos necesarios para realizar dichas actividades.



**Figura 2.19.** Izquierda: conejo al interior de la jaula de estabulación. Derecha: conejo sobre el tapiz rodante, durante el entrenamiento físico.

Durante la supervisión fue importante reconocer los signos de dolor o ansiedad, en los animales, tales como: conducta de huida, inmovilidad, defensa o agresividad, taquicardia, agitación (frecuencia respiratoria elevada), fatiga física evidente, micción y/o defecación, vocalizaciones (no siempre audibles para el oído humano), así como también el bienestar aparente del animal, disposición, comportamiento e ingesta de alimentos y líquidos adecuada; con el propósito de

garantizar al máximo posible el bienestar animal de las especies, y por ende, en caso necesario, poder tomar todas las medidas necesarias para el evitarles cualquier tipo de sufrimiento innecesario. Durante la estabulación se registraron las ingestas diarias de agua y alimento, así como también cualquier cambio en la salud o estado general de los animales.

### **2.2.3. Protocolo de clasificación de los animales empleados en el estudio**

Los animales utilizados en el estudio fueron distribuidos en 3 grupos para su estabulación, los cuales permanecieron en condiciones sedentarias, o bien, fueron sometidos a un protocolo de entrenamiento físico diario. Una parte de los animales que permanecieron en condiciones sedentarias, recibieron durante la fase experimental una infusión con un fármaco bloqueante de los canales de  $K_{ATP}$  (glibenclamida), mientras que el resto de animales recibió la infusión sin el fármaco bloqueante. Según lo anterior, los animales fueron divididos en los siguientes grupos de estudio:

- 1. Grupo control:** corazones provenientes del grupo de conejos que permanecieron en condiciones sedentarias, es decir, que no fueron sometidos a ningún tipo de entrenamiento físico. Durante la fase experimental, en estos corazones, después de la valoración de parámetros electrofisiológicos se procedió a realizar la ligadura de la arteria coronaria circunfleja para provocar la isquemia, y posteriormente inducir la FV mediante electroestimulación sobre la pared ventricular a frecuencias crecientes.
- 2. Grupo entrenado:** corazones provenientes del grupo de conejos sometidos a un protocolo de entrenamiento físico, a los que después

de la valoración de parámetros electrofisiológicos se procedió a realizar la ligadura de la arteria coronaria circunfleja para provocar la isquemia y posteriormente se les indujo la FV mediante electroestimulación sobre la pared ventricular a frecuencias crecientes.

- 3. Grupo tratado con glibenclamida:** corazones del grupo de conejos sin entrenar a quienes se les administró, durante la fase experimental, glibenclamida: un bloqueador de canales de  $K_{ATP}$ . En estos corazones, después de la valoración de parámetros electrofisiológicos, se procedió a infundir por bomba una dosis de glibenclamida a una concentración de 100  $\mu\text{m}$ , y posteriormente se realizó la ligadura de la arteria coronaria circunfleja para provocar la isquemia, y posteriormente se indujo la FV mediante electroestimulación sobre la pared ventricular a frecuencias crecientes.

#### 2.2.4. Protocolo de entrenamiento físico

Para el protocolo de entrenamiento se empleó una cinta rodante especialmente diseñada para animales de laboratorio de mediano tamaño. Este protocolo se realizó durante un total de 7 semanas, que comprendió dos fases:

- 1. Fase de familiarización:** la primera semana del protocolo correspondió con la semana de familiarización en la cinta rodante, para facilitar al conejo la adaptación al ejercicio en este tipo de sistemas. En esta etapa de familiarización se buscó que el conejo lograra progresivamente perder el miedo al “*treadmill*” y pudiera adaptarse al tipo de movimiento de la banda y a la manipulación por

parte del experimentador, con la intención de que el animal se involucrara y participara activamente durante el entrenamiento. Para lograrlo, se estimulaba al conejo con ligeros tactos sobre su lomo para que se moviera en dirección contraria a la cinta rodante y así pudiera correr sobre la cinta 4 series, de 2 minutos cada una, con un minuto de descanso, a una intensidad inicial al comienzo de la semana de 0,11 m/s de velocidad, que se fue incrementando progresivamente, durante cada serie y cada sesión, para que al final de la semana de familiarización corrieran a unos 0,33m/s.

- 2. Fase de entrenamiento:** en esta fase se llevó a cabo el entrenamiento físico como tal y se realizó 5 días a la semana durante 6 semanas, con una duración promedio de 29 minutos por día. Este entrenamiento consistió en hacer que el conejo corriera 6 series en la cinta rodante, de 4 minutos de duración cada una, con intervalos de 1 minutos de descanso. Durante cada serie se ajustó la intensidad del ejercicio a una velocidad de 0,33 m/s.

La correcta realización del ejercicio sobre la cinta rodante fue constantemente supervisada por dos colaboradores, cada uno de los cuales se encargó del entrenamiento de un conejo. Los conejos que una vez iniciado el período de entrenamiento no corrieron adecuadamente durante cinco sesiones consecutivas, fueron excluidos del grupo entrenado. Se entrenó a 4 conejos simultáneamente durante el mismo periodo, al final del cual se les sacrificó para realizar el estudio electrofisiológico.

Los conejos no entrenados (grupo control y el tratado con glibenclamida) permanecieron en las respectivas jaulas durante el mismo tiempo que los conejos sometidos a entrenamiento, esto es, seis semanas, más la semana que entraña la

familiarización de los conejos entrenados con la cinta, lo que da un total de 7 semanas. En la octava semana se procedió a sacrificar los animales.



*Figura 2.20.* Conejo durante el entrenamiento de carrera sobre tapiz rodante.

### **2.2.5. Medidas correctoras previstas en caso de sufrimiento animal**

En primer lugar, se procuró un manejo adecuado y cuidadoso del animal. Si se llegó a observar un cambio en el estado de salud del conejo se optó por brindarle la asistencia sanitaria y terapéutica que sugiriera la veterinaria del centro. En el caso de que se debiera a estrés durante los traslados, se intentaba hacerlo de la manera más tranquila, rápida y menos molesta para el animal a fin de que pudiera sentirse más relajado. Si ninguna de las anteriores estrategias era válida para la situación, se optó por una supresión temporal de las manipulaciones.

Para proveer las mejores condiciones al animal, empleamos equipos específicamente diseñados para la especie, ya sea para realizar el protocolo de

entrenamiento o para la eutanasia. Para esto los mismos se mantuvieron en condiciones de limpieza y funcionamiento adecuados.

En caso de que el sufrimiento del animal persistiera o fuera grave, pese a las medidas terapéuticas tomadas, se procedía al sacrificio del animal, de la misma manera en que se debe realizar el sacrificio al final de un experimento.

El personal que realice el sacrificio debe estar entrenado para cada método en particular. Debe disminuirse al mínimo posible la ansiedad del animal debida a la manipulación o la restricción del movimiento. Es aconsejable que el sacrificio lo realice una persona con quien el animal esté familiarizado. En todos los casos, luego de aplicado el método de sacrificio elegido, debe certificarse la muerte del animal mediante cese de la respiración y latido cardíaco o falta de respuesta a los reflejos.

### **2.2.6. Preparación experimental**

Al iniciar la preparación experimental, se pesó a cada uno de los conejos, con el propósito de determinar la cantidad exacta de anestesia. Posteriormente, se introdujo al conejo en un inmovilizador adecuado para su especie y a través de la vena marginal de la oreja se procedió a la heparinización con 800 UI de heparina sódica Rovi® al 5 %, y anestesia intravenosa con 12,5 mg/kg de ketamina, Ketolar®. Luego se sacrificaron mediante contusión cervical. Después de la eutanasia, se procedió a realizar una toracotomía medioesternal y pericardiotomía, se extrajo el corazón rápidamente, seccionándolo por su pedículo vascular, y se sumergió en una solución de Tyrode fría (1 - 5 °C.), para reducir en lo posible el deterioro del corazón durante su manipulación, previa a su ubicación en el sistema de perfusión de tipo Langendorff.

Tras seccionar la arteria pulmonar y a continuación diseccionar la arteria aorta ascendente, ésta se seccionó también y se conectó al sistema de Langendorff, mediante fijación por nudo con hilo de seda de entre 1 - 2 mm de diámetro, perfundiendo el corazón retrógradamente con la solución de Tyrode a 37 °C, y con una presión de perfusión inicial de 60 mm Hg.

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

Posteriormente, y antes de la colocación de los electrodos, se circundó la arteria coronaria circunfleja con seda trenzada estéril 2-0 (TC-12 / CT 20 mm 1/2), de Laboratorio Aragón®, S.A.

A continuación, sobre la pared epicárdica se colocaron los diversos electrodos, tanto para el registro de la actividad eléctrica como para la estimulación. Sobre la aurícula derecha se situó un electrodo bipolar para la estimulación auricular y un electrodo bipolar para el registro electrográfico auricular. De la misma forma, otro electrodo bipolar se ubicó en el ventrículo izquierdo para su estimulación. Para el registro de los electrogramas ventriculares, se ubicó sobre la superficie epicárdica, en la pared lateral del ventrículo izquierdo, una placa multielectrodo de 256 electrodos unipolares de acero inoxidable. El electrodo indiferente estaba formado por una placa de Ag/AgCl, de 4 x 6 mm, y situada sobre la aorta canulada, el cual actuó como toma de tierra.



**Figura 2.21.** Distintos momentos de la preparación experimental: peso del animal, anestesia, cirugía para extracción del corazón, fijación del órgano en el sistema de Langendorff y posicionamiento de los electrodos.

Después de posicionar los electrodos de estimulación, estos fueron conectados al estimulador Grass® S88. Mediante este equipo se logró la estimulación del tejido epicárdico, mediante la emisión de impulsos rectangulares, de una duración de 2 segundos y con una intensidad del doble del umbral diastólico.

Durante todo el experimento, el procesamiento de los registros electrográficos fue realizado mediante el sistema de cartografía de la actividad

eléctrica cardíaca MapTech®, incorporado a un ordenador con una tarjeta de adquisición de datos y junto con el programa informático PaceMap®, el cual permitió monitorizar y posteriormente analizar el comportamiento de las señales obtenidas durante este estudio.

### 2.2.7. Protocolo experimental

Tras ubicar el corazón, proveniente tanto de animales entrenados, como de los no entrenados y de los no entrenados tratados con el inhibidor de los canales de la corriente  $I_{KATP}$ ; en el sistema de Langendorff y situar los electrodos en el lugar correspondiente, se dejó estabilizar la preparación durante 20 minutos, y se procedió a realizar el siguiente protocolo:

1. **Estimación del flujo coronario:** durante 1 minuto, en un vaso de precipitados, se recogió el Tyrode que drena desde la arteria pulmonar y se cuantificó por análisis gravimétrico con una báscula de precisión, como se observa en la Figura 2.22.



*Figura 2.22.* Balanza de precisión.

2. **Determinación de la velocidad de infusión:** se calculó el volumen del flujo coronario durante una hora, multiplicando el volumen de Tyrode recogido en 1 minuto por 60 (1 hora); y luego se dividió entre 100 (factor de dilución empleado). Esta medición nos permite obtener el flujo al cual debía ser infundido el vehículo o vehículo+glibenclamida en el corazón.
  
3. **Registro electrográfico basal,** se grabó durante 10 segundos para la determinación de la frecuencia cardiaca, como se observa en la Figura 2.23.



*Figura 2.23.* Captura de un registro electrográfico basal auricular y ventricular.

4. **Determinación del umbral de excitación ventricular:** se determinó el umbral de estimulación del corazón, con ayuda del estimulador GRASS S88®, de la siguiente manera: con el electrodo de estimulación, ubicado sobre la pared ventricular, se disparó un

pulso eléctrico (onda de estimulación) a una frecuencia constante de 4-5 pulsos por segundo y una duración del estímulo, también constante, de 2 milisegundos. Luego se fue disminuyendo progresivamente la intensidad de estimulación, hasta alcanzar el umbral diastólico, que es la mínima intensidad de estimulación que aplicamos capaz de excitar al corazón. Para realizar el protocolo, estimulamos el corazón con una intensidad del doble del umbral diastólico.

5. **Test del extraestímulo ventricular** con una longitud del ciclo de estimulación 10 % menor que la longitud del ciclo sinusal básico. Aunque el referente de la refractariedad en este trabajo fue el periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular, como contraste también se determinó con el test del extraestímulo
6. **Infusión, de Tyrode** (en los grupos control y entrenado) **o del inhibidor de los canales de membrana que vehiculan la corriente  $I_{KATP}$**  (en el grupo glibenclamida), en la raíz aórtica.
7. **Estimulación a frecuencia fija** para el posterior estudio de la velocidad de conducción. Este proceso, aunque fue realizado como parte del protocolo experimental, no fue empleado para determinar nuestras variables de estudio.
8. **Inducción de la fibrilación ventricular (FV)** mediante estimulación a frecuencias crecientes. Esto nos permitió realizar las correspondientes medidas de parámetros basados en el análisis de la FV: períodos refractarios funcionales, energía de la señal, frecuencia dominante de la FV, y energía para revertir el proceso.

9. Tras un período de 5 minutos de FV, y sin interrumpir la misma, **se procedió a la oclusión de la arteria coronaria circunfleja** en un punto situado aproximadamente a mitad de su recorrido epicárdico. La oclusión arterial coronaria se realizó pasando una aguja de sutura con hilo de poliéster a través del miocardio adyacente a la arteria. Con el hilo de sutura se realiza un nudo alrededor de la arteria, para interrumpir el flujo coronario. La efectividad de la oclusión se comprobó mediante la observación de la presión registrada en la raíz aórtica y por el desnivel del segmento ST observado en los electrogramas. El tiempo de oclusión anterior a la desfibrilación fue de 10 minutos.

### **2.2.8. Protocolo para revertir la fibrilación ventricular**

Finalizado el paso anterior, se procedió al estudio de la energía necesaria para revertir la FV, mediante un desfibrilador *ad hoc*, tal como se observa en la Figura 2.24. Para esto, se realizaron sucesivos intentos desfibrilatorios partiendo de una energía de 0,05 Julios, incrementando dicha energía en escalones de 0,01 Julios de forma sucesiva hasta la reversión de la FV. En los casos en los que, tras el cese, hubo recurrencia de la citada arritmia, se reanudó el protocolo de descargas desde la última energía aplicada. En estos casos, una vez agotados tres episodios sucesivos de desfibrilación con recurrencia, se continuó incrementando la energía de la manera habitual hasta recuperar el ritmo sinusal.



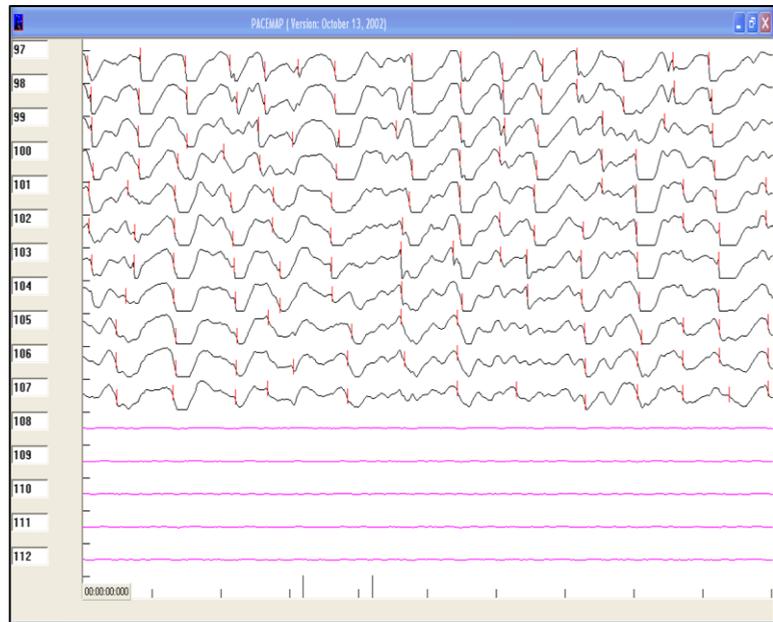
**Figura 2.24.** Desfibrilando un corazón mediante la aplicación de un choque de onda, a través de las placas metálicas del desfibrilador *ad hoc*.

### **2.2.9. Protocolo de marcaje de los registros electrográficos**

El marcaje de los momentos de activación del tejido epicárdico ventricular es imprescindible para determinar los diferentes parámetros electrofisiológicos que se analizaron en este estudio. Para realizar este marcaje se deben seguir los siguientes pasos:

1. Seleccionar, del correspondiente archivo de PaceMap<sup>®</sup>, dos intervalos de tiempo de 2 segundos. El primero, tras los 5 minutos y 30 segundos de FV mantenida, precisamente antes de la oclusión arterial coronaria; y luego el segundo, pasados 5 minutos y 30 segundos después de dicha oclusión.
2. Proceder al marcado de la señal electrográfica en todos y cada uno de los electrogramas (Figura 2.25.), operando según el siguiente criterio: el marcado de las señales electrográficas se realiza de forma

semiautomática, mediante la identificación por parte del programa de la máxima pendiente negativa del trazado ( $dv/dt$ ). El umbral mínimo de este parámetro, para ser considerado como una deflexión local, es un 20 % del máximo valor obtenido con cada electrodo. No obstante, el lugar de ubicación de la ventana del cursor es escogido por nosotros mediante la observación de los electrogramas. En los trazados con potenciales múltiples se asigna el instante de activación a la deflexión con máxima pendiente negativa, situando manualmente la ventana de marcado sobre el complejo de activación.



**Figura 2.25.** Registro electrográfico de FV visualizado con el programa PaceMap®. En el canal 97 se observa claramente un trazado de FV, en el que se han identificado y marcado los momentos de activación. Por el contrario, los registros de los electrodos 108-112, muestran una mala señal y deben ser eliminados.

A través de este proceso de marcado es posible realizar el análisis de la señal en el dominio del tiempo. Por medio de este se pudieron obtener los intervalos VV, al igual que los PRFFV, en dos situaciones: pre-oclusión y post-oclusión, en los tres grupos objetos de este estudio: control, entrenado y glibenclamida (bloqueador del canal  $K_{ATP}$ ).

Por lo anteriormente descrito, el resultado del análisis de la señal fibrilatoria en el dominio del tiempo, puede verse alterado de manera indirecta, debido al criterio subjetivo de valoración del investigador que realiza el marcaje. Para tratar de disminuir al máximo este error, y descartar las posibles “malas señales”, se estimó conveniente:

- Eliminar los registros de todos los electrodos no operativos, puesto que no proporcionaban registro alguno.
- Eliminar los registros de los electrodos defectuosos ya que se observaba una muy baja amplitud al compararlos con los registros de electrodos cercanos,
- Eliminar los registros que no presenten un trazado fiable. Esto es, que no se observara una clara pendiente de despolarización o que se apreciaran alteraciones evidentes del trazado eléctrico, debidas probablemente a manipulaciones de los electrodos sobre la pared epicárdica o a manipulaciones del propio corazón, como también a cualquier interferencia eléctrica producida por equipos electromagnéticos.

#### **2.2.10. Parámetros electrofisiológicos: definiciones y determinación de los mismos**

Después de haber realizado todo el protocolo electrofisiológico, se procede al análisis de los diversos parámetros electrofisiológicos de la señal electrográfica,

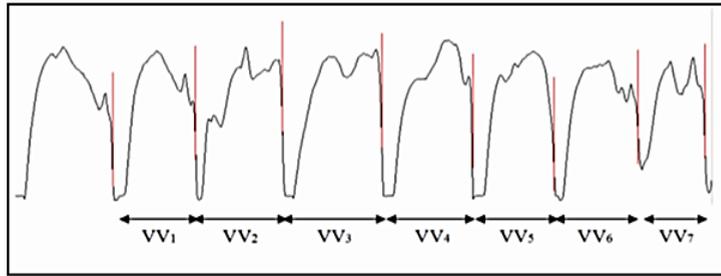
proveniente del tejido epicárdico, durante la fibrilación ventricular, antes y después de realizar la oclusión arterial coronaria (OAC), los cuales se detallan a continuación.

#### ***2.2.10.1. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración del cronotropismo***

- **Longitud del ciclo sinusal (LCS):** la longitud del ciclo sinusal es la función inversa de la frecuencia cardíaca. Esta última define el número de despolarizaciones ventriculares espontáneas por minuto. Por el contrario, la LCS se define como el periodo de tiempo que transcurre entre una activación auricular o ventricular, y la siguiente. La medida de la LCS se realiza directamente sobre el trazado electrográfico y su valor está expresado en milisegundos.

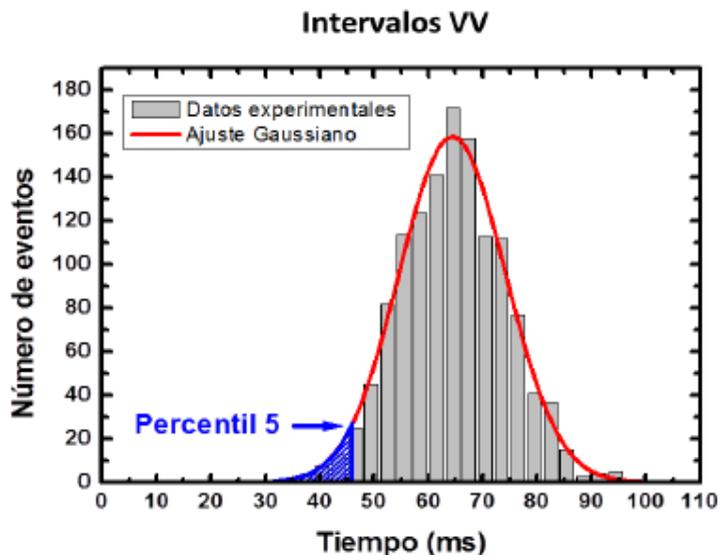
#### ***2.2.10.2. Parámetros electrofisiológicos utilizados para la valoración de la refractariedad miocárdica***

- **Intervalos VV:** el periodo de tiempo (en milisegundos) entre dos activaciones ventriculares consecutivas durante la FV, se conoce como intervalo VV. Es a través del marcaje de los momentos de activación ventricular (Figura 2.26.), durante un intervalo de 2 segundos, antes y después de la oclusión arterial coronaria; que es posible definir dichos intervalos, los cuales además son indispensables para poder determinar el periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.



**Figura 2.26.** Registro electrográfico de FV en el que se pueden apreciar las marcas efectuadas sobre los momentos de activación del proceso fibrilatorio y consecuentemente los intervalos VV entre dichos momentos.

- Periodo refractario funcional durante la FV (PRFFV):**  
 estimado como el percentil 5 de un histograma de todos los intervalos V-V durante la FV inducida. El percentil 5 de los intervalos VV se ha obtenido a partir de los citados histogramas mediante el programa informático PaceMap (Figura 2.27).



**Figura 2.27.** Representación de la distribución gaussiana a partir de los intervalos VV. El percentil 5 corresponde al área sombreada en azul bajo la línea del ajuste gaussiano.

### ***2.2.10.3. Parámetros electrofisiológicos para el análisis de la frecuencia de la fibrilación ventricular (FV)***

La frecuencia dominante de la fibrilación ventricular es, tras la descomposición por la transformada rápida de Fourier de la fibrilación ventricular en sus infinitos armónicos, la senoide que coincide con aquél armónico que posee la mayor amplitud. El análisis espectral de la fibrilación ventricular se efectuó utilizando bloques de datos de 2048 puntos, aplicando la ventana de Hamming. Se obtuvo para cada bloque la frecuencia dominante. La frecuencia dominante media (FDM) es la media de las frecuencias dominantes registradas por todos los 256 electrodos unipolares de la placa multielectrodo, en un tiempo determinado de la fibrilación ventricular. Para este análisis se ha utilizado el periodograma de Welch, que se basa en los estudios clásicos de Fourier sobre los armónicos constituyentes de una onda compuesta. El procesamiento de datos fue efectuado mediante el programa informático MatLab® 7.6 dentro de la aplicación MedMap y gracias a este se pudo obtener las siguientes frecuencias dominantes:

- **Frecuencia dominante máxima (FDMax):** es la frecuencia máxima del espectro registrado por el multielectrodos en un tiempo determinado de la fibrilación ventricular.
- **Frecuencia dominante mínima (FDMin):** es la frecuencia mínima del espectro registrado por el multielectrodo en un tiempo determinado de la fibrilación ventricular.
- **Frecuencia dominante media (FDM):** es la media de las frecuencias dominantes registradas por el multielectrodo en un tiempo determinado de la fibrilación ventricular.

#### ***2.2.10.4. Parámetro utilizado para analizar la regularidad de la señal fibrilatoria***

- **Energía normalizada (EN):** al analizar la regularidad morfológica de la señal y sus características en el dominio de la frecuencia, se obtuvo el espectro de frecuencias mediante el periodograma de Welch. A partir de este, se identificó la frecuencia dominante del espectro (FD) y la energía normalizada, la cual se define como la energía espectral en una ventana centrada en  $FD \pm 1$  Hz, y normalizada por la energía espectral en la banda de interés (5-35 Hz).

#### ***2.2.10.5. Parámetros utilizados para la valoración de la energía mínima necesaria para revertir la FV***

- **Umbral desfibrilatorio (UD):** energía mínima necesaria aplicada mediante el desfibrilador de doble pala, para interrumpir el proceso fibrilatorio.

#### ***2.2.10.6. Parámetros utilizados para la valoración de la estabilidad electrofisiológica del corazón que ha fibrilado***

- **Desfibrilaciones espontáneas:** se determina durante el experimento, cuando el corazón tras ser inducido en FV, sale de esta, de forma espontánea, y vuelve al ritmo sinusal. Cuando esto

ocurre, es necesario volver a inducir la FV para continuar con el protocolo experimental.

La frecuencia de las desfibrilaciones espontáneas se determinó en relación al número de veces que un corazón salió de manera espontánea de la FV inducida.

- **Recidivas espontáneas:** ocurre cuando el corazón, tras ser desfibrilado mediante la aplicación de choques de ondas bifásicas, entra nuevamente en FV de manera espontánea.

La frecuencia de las recidivas se determinó con el número de veces que un corazón entró nuevamente en FV, de manera espontánea, tras ser desfibrilado mediante choques eléctricos.

### 2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la comparación de un determinado parámetro en los grupos entrenado y tratado, frente a control (de manera separada) previamente a la oclusión coronaria, se aplicó el test de la t de Student, para muestras no apareadas. Para el análisis de esos mismos parámetros, pero tras la oclusión arterial coronaria, frente al valor basal se empleó el programa SPSS para aplicar un ANOVA de dos factores, de medidas repetidas. Al realizar la comparación del grupo entrenado frente al tratado con glibenclamida, antes y después de la OAC, se aplicó igualmente el test ANOVA de dos factores, con medidas repetidas. Solo se consideraron diferencias significativas cuando el valor de  $p \leq 0,05$ .

## 2.4. LEGISLACIÓN

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

## 2.5. FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación fue realizado gracias a la financiación del proyecto titulado “*Efectos del entrenamiento sobre las modificaciones que la isquemia miocárdica produce en parámetros electrofisiológicos arritmogénicos. Implicación de la corriente  $I_{K_{ATP}}$* ”, con referencia DEP2010-22318-C02-01, por parte del antiguo Ministerio de Ciencia e Innovación; y cuyo investigador principal es el doctor Luis Such Belenguer. También ha contribuido en la financiación la ayuda otorgada por la Generalitat Valenciana mediante el programa PROMETEO 2010/093.



## **3. RESULTADOS**

---



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. REFRACTARIEDAD DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR

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

Como se observa en la Tabla 3.1., el PRFFV (percentil 5 de los intervalos fibrilatorios), fue mayor en el grupo entrenado y en el tratado con glibenclamida, que el valor del grupo control, al comparar cada uno de estos con el valor de dicho parámetro con el del grupo control, previamente a la oclusión arterial coronaria. Este parámetro aumentó tras la oclusión coronaria, respecto al valor basal (pre-oclusión), en el grupo control y en el tratado con glibenclamida, manteniéndose en el grupo entrenado.

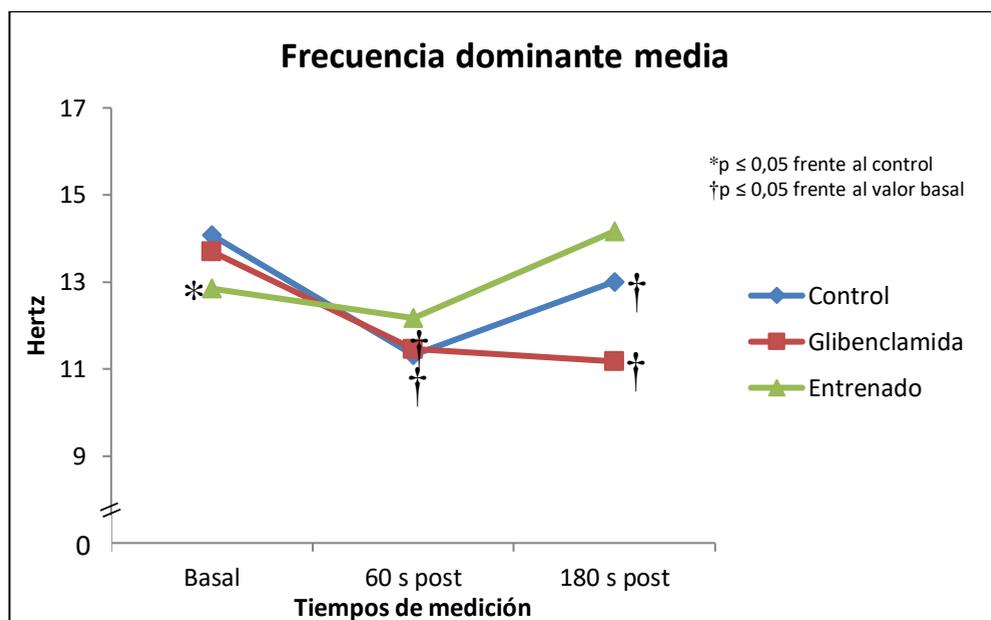
PERIODO REFRACTARIO FUNCIONAL DURANTE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR		
	Pre-oclusión	5 min post-oclusión
<b>Control</b>	43 ± 5 (18)	47 ± 5 <sup>†</sup> (15)
<b>Entrenado</b>	47 ± 5* (12)	46 ± 7 (11)
<b>Glibenclamida</b>	48 ± 5* (16)	55 ± 5 <sup>†</sup> (10)

**Tabla 3.1.** Media del PRFFV, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal, previamente a la oclusión arterial coronaria, y tras 5 min después de la misma. Los valores están expresados en ms. El número de experimentos en paréntesis.; \*p < 0,05 vs. control; †p < 0,05 vs. pre-oclusión.

### 3.1.2. Frecuencia dominante de la FV

En este apartado se exponen en la Figura 3.1. y Tabla 3.2. los resultados en relación a la frecuencia dominante media (FD), y posteriormente en la Tabla 3 se reflejan los resultados con respecto a la frecuencia dominante máxima (FDMax) y mínima (FDMin) de la FV, respectivamente.

Se encontró que la FD de la FV, previamente a la oclusión coronaria, fue menor en el grupo entrenado al compararlo con el grupo control. Este parámetro disminuyó respecto al valor basal, a los 60 segundos y a los 180 segundos tras la oclusión arterial coronaria, tanto en el grupo control como en el tratado con glibenclamida, manteniéndose en relación al valor basal en el grupo entrenado.



**Figura 3.1.** Media y desviación estándar de la FD de la FV, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal (previamente a la oclusión arterial coronaria) y tras 60 s y 180 s, posteriores a la misma. Los valores están expresados en Hz. \* $p < 0,05$  vs. control-basal; † $p < 0,05$  vs. basal-intragrupo.

**FRECUENCIA DOMINANTE MEDIA DE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR**

	<b>Basal</b>	<b>60 s post</b>	<b>180 s post</b>
<b>Control</b>	14 ± 2 (17)	11 ± 2 <sup>†</sup> (15)	13 ± 3 <sup>†</sup> (15)
<b>Entrenado</b>	13 ± 1* (12)	12 ± 2 (11)	14 ± 3 (11)
<b>Glibenclamida</b>	14 ± 1 (14)	11 ± 1 <sup>†</sup> (13)	11 ± 2 <sup>†</sup> (13)

**Tabla 3.2.** Media y desviación estándar de la FD de la FV, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal (previamente a la oclusión arterial coronaria) y tras 60 s y 180 s posteriores a la misma. Los valores están expresados en Hz. El número de experimentos en paréntesis. \*p < 0,05 vs. control-basal; †p < 0,05 vs. basal-intragrupo.

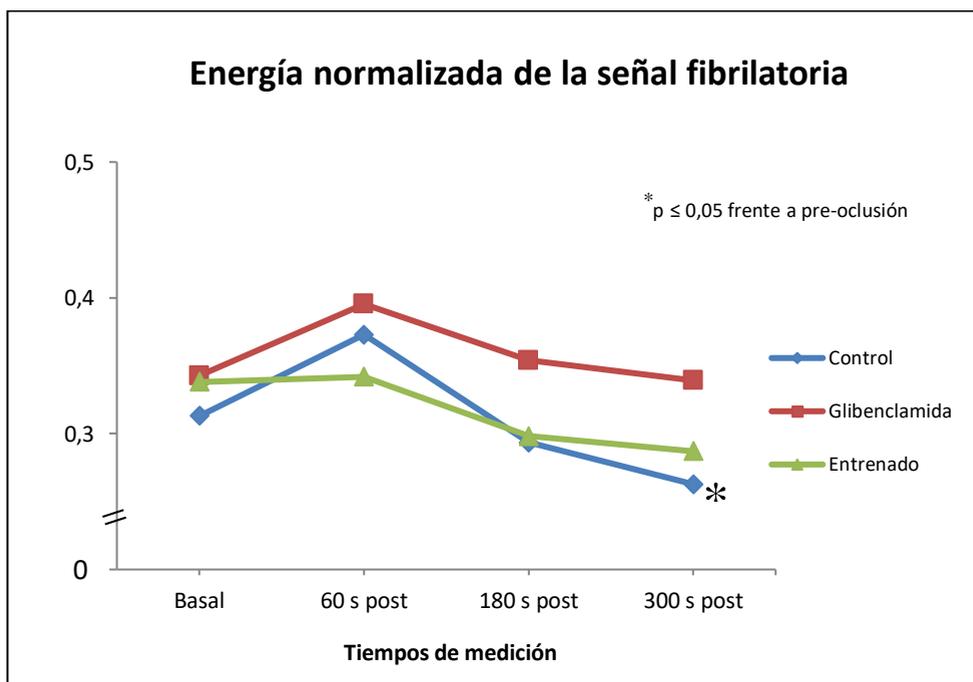
**FRECUENCIA DOMINANTE MÁXIMA Y MÍNIMA DE LA FIBRILACIÓN VENTRICULAR**

	<b>Frecuencia Dominante Mínima (FDMin)</b>			<b>Frecuencia Dominante Máxima (FDMax)</b>		
	<b>Basal</b>	<b>60 s post</b>	<b>180 s post</b>	<b>Basal</b>	<b>60 s post</b>	<b>180 s post</b>
<b>Control</b>	10 ± 1 (17)	8 ± 1 <sup>†</sup> (15)	8 ± 2 <sup>†</sup> (15)	20 ± 5 (17)	17 ± 4 <sup>†</sup> (15)	20 ± 4 (15)
<b>Entrenado</b>	9 ± 2 (12)	8 ± 2 (11)	9 ± 2 (11)	19 ± 5 (12)	16 ± 2 (11)	19 ± 4 (11)
<b>Glibenclamida</b>	10 ± 2 (14)	8 ± 1 <sup>†</sup> (13)	7 ± 1 <sup>†</sup> (13)	18 ± 4 (14)	15 ± 1 (13)	15 ± 2 (13)

**Tabla 3.3.** Media y desviación estándar de la FDMin y FDMax de la FV, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal (previamente a la oclusión arterial coronaria), y tras 60 s y 180 s posteriores a la oclusión. Los valores están expresados en Hz. El número de experimentos en paréntesis. †p < 0,05 vs. basal-intragrupo.

### 3.2. ENERGÍA NORMALIZADA

Al analizar los valores de la energía normalizada (EN) de la señal fibrilatoria, se encontró que la EN se mantuvo tras la oclusión coronaria en el grupo entrenado y en el tratado, y disminuyó tras la oclusión coronaria respecto al valor basal en el grupo control, como se observa en la Figura 3.2. y en la Tabla 3.4.



**Figura 3.2.** Media y desviación estándar de la EN de la señal fibrilatoria, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal previamente a la oclusión arterial coronaria (OAC) y durante 60 s, 180 s y 300 segundos posteriores a la misma. Los valores están expresados en Hz. \* $p < 0,05$  vs. pre-oclusión.

---



---

**ENERGÍA NORMALIZADA DE LA SEÑAL FIBRILATORIA**


---



---

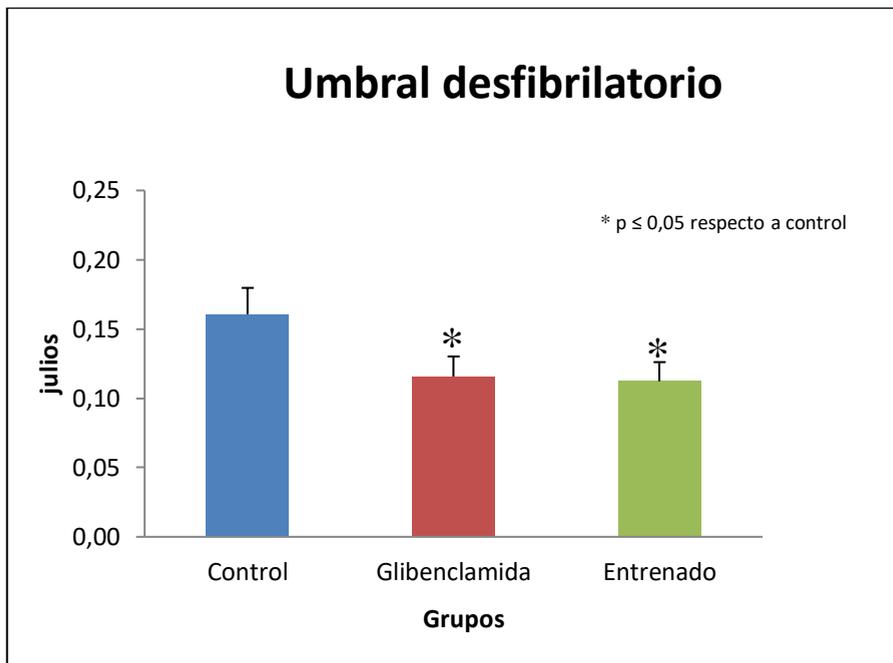
	<b>Basal</b>	<b>60 s post</b>	<b>180 s post</b>	<b>300 s post</b>
<b>Control</b>	0,31 ± 0,08 (19)	0,37 ± 0,05 (17)	0,29 ± 0,04 (17)	0,26 ± 0,03* (18)
<b>Entrenado</b>	0,33 ± 0,06 (11)	0,34 ± 0,07 (11)	0,29 ± 0,05 (11)	0,28 ± 0,05 (10)
<b>Glibenclamida</b>	0,34 ± 0,05 (15)	0,39 ± 0,06 (13)	0,35 ± 0,08 (13)	0,34 ± 0,06 (12)

**Tabla 3.4.** Media y desviación estándar de la EN de la señal fibrilatoria, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, en situación basal previamente a la oclusión arterial coronaria (OAC) y durante los 60 s, 180 s y 300 segundos posteriores a la misma. Los valores están expresados en Hz. El número de experimentos en paréntesis. \*p < 0,05 vs. pre-oclusión.

### **3.3. UMBRAL DE DESFIBRILACIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE CHOQUES ELÉCTRICOS**

En la Figura 3.3., se encuentran los valores medios de la mínima energía que fue necesaria aplicar, mediante un desfibrilador *ad-hoc*, a los corazones aislados pertenecientes a cada uno de los grupos de estudio, para revertir la fibrilación ventricular.

Al comparar la energía media que fue necesaria para desfibrilar los corazones en los tres grupos de estudio, se encontraron diferencias significativas entre el grupo entrenado y el grupo tratado con glibenclamida con respecto al grupo control. Tanto el grupo entrenado como el tratado requirieron una energía menor que el grupo control para revertir la fibrilación ventricular, siendo muy similares las respuestas en los dos primeros grupos.



**Figura 3.3.** Media y error estándar de la mínima energía que fue necesaria aplicar para desfibrilar los corazones de conejos, en cada uno de los tres grupos. La energía fue aplicada mediante un desfibrilador *ad-hoc*. Los valores están expresados en julios. \* $p < 0,05$  vs. control.

### 3.4. OTROS RESULTADOS DE INTERÉS

A continuación, expondremos los resultados correspondientes a determinaciones que, si bien no han constituido el objetivo fundamental del presente trabajo, son consideradas de interés, y se han podido obtener en los correspondientes experimentos. Estos resultados están particularmente ligados a los efectos electrofisiológicos del entrenamiento sobre el cronotropismo sinusal (longitud del ciclo sinusal) y sobre otras respuestas electrofisiológicas (desfibrilaciones espontáneas y recidivas tras la desfibrilación con choques) así como sobre algunas características antropométricas de los animales.

### 3.4.1. Respecto al cronotropismo sinusal

En la Tabla 3.5. se exponen los resultados en relación a la longitud del ciclo sinusal (LCS) como indicador del cronotropismo sinusal. Al comparar por separado la LCS, del grupo entrenado y del grupo tratado con glibenclamida separadamente frente al grupo control, previamente a la infusión de vehículo o fármaco, encontramos que dicho parámetro fue mayor ( $p = 0,054$ ) en el grupo entrenado, al compararlo con el grupo control. Al comparar los valores de este parámetro, tras la infusión (vehículo o glibenclamida), frente al valor de dicho parámetro en situación basal dentro de cada grupo, encontramos que el valor del parámetro citado aumentó en el grupo tratado con glibenclamida tras la administración de la misma.

---

#### LONGITUD DEL CICLO SINUSAL

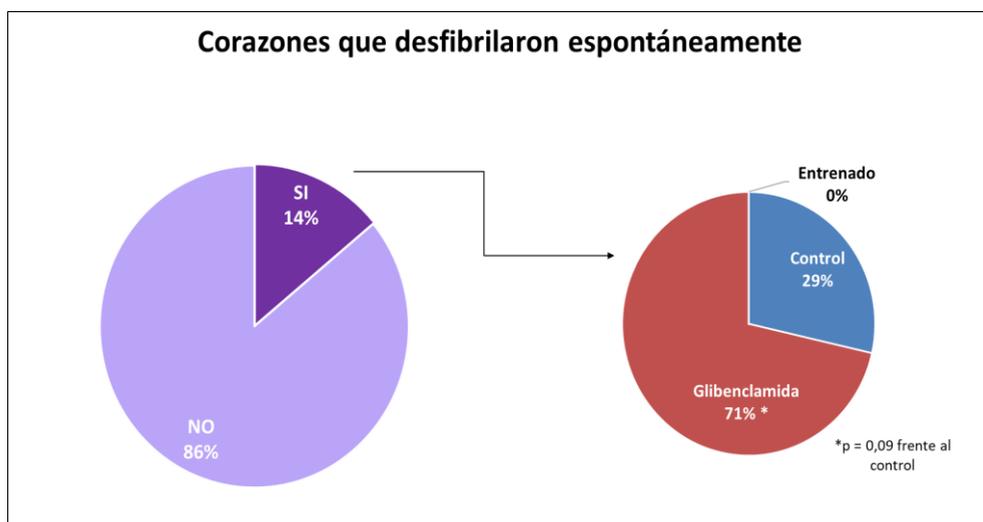
---

	Pre-infusión	Post- infusión
<b>Control</b>	314 ± 27 (14)	313 ± 39 (14)
<b>Entrenado</b>	358 ± 92* (14)	349 ± 81 (14)
<b>Glibenclamida</b>	324 ± 31 (16)	335 ± 28 (16)

**Tabla 3.5.** Media y desviación estándar de la LCS, en los grupos control, glibenclamida y entrenado, antes y después de la infusión. Los valores están expresados en ms. El número de experimentos en paréntesis. \* $p = 0,054$  respecto al grupo control pre-infusión.

### 3.4.2. Desfibrilaciones espontáneas

En la Figura 3.4. se observa la capacidad que mostraron los corazones de cada uno de los grupos, para revertir de manera espontánea la fibrilación, tras haber sido desencadenada esta última mediante el TEEV. Se observa que, del total de corazones, el 14 % lograron desfibrilar espontáneamente. De ellos, el 71 % correspondió al grupo tratado con glibenclamida y el 29 % al grupo control. El grupo entrenado no exhibió desfibrilaciones espontáneas. Al comparar el grupo control con el entrenado, no se detectaron diferencias significativas. El número de desfibrilaciones espontáneas tendió a ser mayor en el grupo tratado con glibenclamida ( $p = 0,09$ ) que en el grupo control.



**Figura 3.4.** Porcentaje de los corazones de conejos pertenecientes a los grupos control, entrenado y glibenclamida que desfibrilaron espontáneamente, tras haberles inducido una fibrilación ventricular.  $p = 0,09$  frente al control.

Otra de las variables que determinamos en este estudio fue el número de desfibrilaciones espontáneas en cada uno de los corazones, de los tres grupos de estudio (Tabla 3.6.). Se encontró que los dos corazones del grupo control que desfibrilaron espontáneamente, lo hicieron tan solo una vez, mientras que los

corazones del grupo tratado con glibenclamida mostraron una actividad desfibrilatoria espontánea mucho más reactiva, que la del grupo control y que el grupo entrenado. En el grupo de glibenclamida, de los 5 corazones que desfibrilaron, al menos uno logró desfibrilar espontáneamente hasta 3 veces, luego de haberle inducido nuevamente en FV, tras cada desfibrilación espontánea.

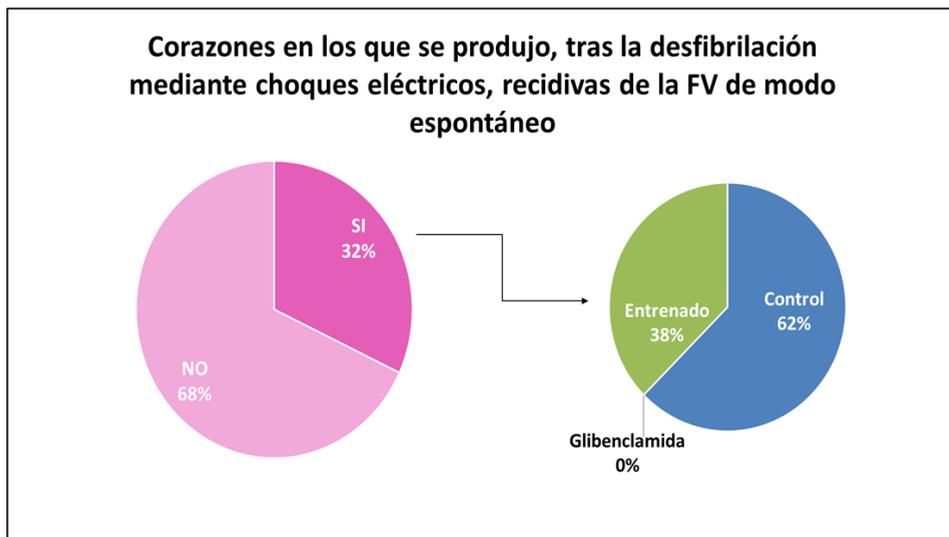
### FRECUENCIA DE DESFIBRILACIONES ESPONTÁNEAS

Desfibrilaciones espontáneas por corazón	Control (18)	Glibenclamida (16)	Entrenado (15)
1	2	1	0
2	0	3	0
3	0	1	0
<b>Total</b>	2 (18)	5 (16)	0 (15)

**Tabla 3.6.** Frecuencia de desfibrilaciones espontáneas ocurridas en cada uno de los corazones pertenecientes a los grupos control, entrenado y glibenclamida. Los valores están expresados en unidades. El número total de experimentos en paréntesis.

#### 3.4.3. Recidivas espontáneas

Con respecto a las recidivas se encontró que, del total de corazones desfibrilados mediante la aplicación de choques eléctricos, el 32 % de ellos entraron nuevamente en FV de manera espontánea. De ellos, el 62 % correspondió al grupo control, seguido del grupo entrenado con el 38 %, como se observa en la Figura 3.5.



**Figura 3.5.** Comportamiento desfibrilatorio espontáneo y recidivas fibrilatorias espontáneas exhibidas por los corazones de conejos pertenecientes a los grupos control, glibenclamida y entrenado.

Con respecto al número de veces que un corazón entró de manera espontánea nuevamente en FV, después de esta haber sido revertida a través del choque de ondas bifásicas, encontramos lo siguiente (Tabla 3.7.): ninguno de los corazones del grupo tratado con glibenclamida desencadenó una fibrilación ventricular de manera espontánea. Por el contrario, en el grupo control, 4 de los corazones presentaron una vez una FV recidivante, otros 3 corazones desarrollaron 2 veces fibrilaciones espontáneas, uno fibriló espontáneamente 3 veces y dos corazones del grupo llegaron a fibrilar hasta más de 9 veces. Con respecto al grupo entrenado, 3 de los corazones entraron tan solo una vez en fibrilación de manera espontánea, 2 lo hicieron dos veces y solo un corazón de ese grupo presentó 3 recidivas.

**FRECUENCIA DE FIBRILACIONES VENTRICULARES  
RECIDIVANTES**

Recidivas espontáneas	Control (18)	Glibenclamida (16)	Entrenado (15)
1	4	0	3
2	3	0	2
3	1	0	1
>9	2	0	0
<b>Total</b>	10 (18)	0 (16)	6 (15)

**Tabla 3.7.** Número de fibrilaciones espontáneas (recidivas) ocurridas, después de haber revertido la fibrilación (inducida con el TEEV), mediante choque de ondas bifásicas, en cada uno de los corazones de conejos pertenecientes a los grupos control, entrenado y glibenclamida.

### 3.4.4. Peso corporal del conejo, peso de su corazón y flujo coronario

En este apartado podemos observar el comportamiento de estas tres variables de manera simultánea en cada uno de los tres grupos de estudio (Tabla 3.8.).

Primero, respecto al peso corporal de los conejos, recordamos que este se determinó antes y después del periodo de estabulación para cada uno de los tres grupos: control, entrenado y glibenclamida, pero se tuvo en cuenta solo el valor del peso al final de la estabulación para hacer la tabla comparativa, puesto que fue el momento en el que los animales fueron sacrificados y finalmente se aisló el corazón para su estudio.

Antes de proceder con la fase quirúrgica, se determinó el peso corporal total de los conejos de cada uno de los grupos de estudio y se encontró como se observa en la Tabla 3.8., que el grupo tratado con glibenclamida mantuvo un peso significativamente mayor que el grupo control (tal como se encontró al inicio de la estabulación). En el grupo entrenado no se observaron diferencias con respecto al grupo control.

Posterior al sacrificio, se procedió a aislar el corazón y se determinó el peso de cada uno de los corazones de los conejos pertenecientes al grupo control, al grupo entrenado y al grupo tratado con glibenclamida, en el cual no se encontraron diferencias significativas entre sí.

Con respecto a la razón entre el peso del corazón y el peso corporal del conejo, esta fue más alta en el grupo entrenado, que en los grupos control y glibenclamida, como se observa en la Tabla 3.8.

Finalmente, después de aislar el corazón y conectarlo al sistema Langendorff, se determinó el flujo coronario medio antes de administrar la infusión (del vehículo o vehículo+glibenclamida), en los tres grupos de estudio, y se encontró que el grupo glibenclamida tuvo un flujo coronario medio significativamente más alto al compararlo con el grupo control, tal como se expone en la Tabla 3.8.

---



---

**CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS EN EL CONEJO**

---



---

	<b>Control</b>	<b>Glibenclamida</b>	<b>Entrenado</b>
<b>Peso corporal (g)</b>	3607 ± 0,2 (20)	3937 ± 0,3* (16)	3635 ± 0,3 (15)
<b>Peso del corazón (g)</b>	14 ± 2 (20)	15 ± 1 (15)	15 ± 2 (14)
<b>Razón peso corazón/peso corporal (mg/g)</b>	4 (20)	4 (15)	4 (14)
<b>Flujo coronario medio (ml/min)</b>	70 ± 9 (20)	80 ± 14* (16)	75 ± 11 (15)

**Tabla 8.** Media y desviación estándar del peso corporal del conejo, peso de su corazón, ratio del peso del corazón/peso corporal y flujo coronario en cada uno de los tres grupos de estudio. El número de experimentos en paréntesis. \*p < 0,05 respecto al grupo control



## **4. DISCUSIÓN**

---



## 4. DISCUSIÓN

En la presente tesis ha sido investigado el efecto del ejercicio físico crónico sobre algunas propiedades electrofisiológicas miocárdicas relacionadas con la instauración de arritmias por reentrada que amenazan la vida, y asimismo la posible participación del canal  $K_{ATP}$  en las modificaciones inducidas por el entrenamiento, a través del bloqueo de dicho canal. Estas propiedades se han determinado a través del análisis espectral de la fibrilación ventricular inducida sin interrupción de la perfusión global (frecuencia dominante y regularidad de la señal) y del análisis de la arritmia en el dominio del tiempo, que traducen indirectamente modificaciones de la refractariedad y de la heterogeneidad. Asimismo, ha sido investigada la mínima cantidad de energía necesaria para desfibrilar mediante la aplicación de choques eléctricos, con ondas bifásicas, y algunos aspectos del comportamiento eléctrico del miocardio tras la desfibrilación (recidivas tras la desfibrilación con choques). Estos parámetros han sido analizados en el miocardio sometido a perfusión normalmente oxigenada y tras isquemia regional aguda, no solamente en corazones de animales entrenados físicamente, sino también en corazones sometidos al bloqueo del canal  $K_{ATP}$  con glibenclamida, y en corazones de animales control. Este estudio ha pretendido, no solamente asentar los efectos electrofisiológicos del ejercicio físico crónico, ya iniciado su estudio con anterioridad, sino también tratar de contribuir a dilucidar el papel del canal  $K_{ATP}$  en las modificaciones electrofisiológicas inducidas por el ejercicio. Adicionalmente, y con carácter menor, han sido estudiados otros parámetros como la facilidad con la que se produce reversión espontánea de la fibrilación y el cronotropismo sinusal.

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

### **4.1.1. Respecto a la idoneidad de la especie seleccionada**

La utilización de modelos animales para el estudio de las enfermedades cardiovasculares ha contribuido sustancialmente a la mejora del conocimiento de sus fisiopatologías. En este sentido, el conejo se ha consolidado como un buen modelo en los laboratorios de investigación, para estudios en corazón aislado y perfundido y en situaciones de isquemia y en las investigaciones que pretenden analizar el proceso de remodelación cardiaca (para revisión ver Verdow *et al.*, 1998).

En nuestra investigación, la razón principal para esta elección radica en que el corazón de conejo es muy similar en ciertos aspectos al corazón humano. Así, el corazón de conejo en condiciones fisiológicas presenta escasa circulación coronaria colateral, lo que origina las consecuencias fisiopatológicas correspondientes tras la oclusión arterial coronaria aguda, y hay que tener en cuenta que nuestro estudio incluye la situación de isquemia aguda.

Dado que la presente investigación se relaciona con los efectos electrofisiológicos del entrenamiento, el conejo de laboratorio es, en opinión de diversos autores un modelo idóneo (DiCarlo y Bishop, 1990, Such *et al.*, 2002, 2008 y 2018) por las razones que a continuación exponemos. Efectivamente, como ha sido publicado con anterioridad, usando el protocolo de entrenamiento del presente estudio, la frecuencia cardíaca *in vivo* fue menor en los animales entrenados que en los animales no entrenados. Además, la duración del ciclo sinusal analizada en el corazón aislado, también como un parámetro cardiovascular de entrenamiento, fue

mayor en los conejos entrenados que en los controles. No solo los parámetros cardiovasculares evidenciaron el efecto del protocolo sobre cinta sin fin, sino que también se modificaron los parámetros bioquímicos Hsp60 e iNOS (Such *et al.*, 2008).

Como se ha hecho constar en publicaciones previas, el presente modelo “simula humanos sedentarios que realizan ejercicio moderado como protección cardiovascular contra las arritmias que amenazan la vida” (Such *et al.*, 2018). A semejanza de los seres humanos en general, el conejo de laboratorio es un animal sedentario y sometándolo a protocolos de ejercicio físico, como el aplicado por nosotros, se consiguen fácilmente respuestas características del entrenamiento físico (DiCarlo y Bishop, 1990).

Por otra parte, como hemos visto, hemos desencadenado la fibrilación ventricular en los corazones aislados. Se requería corazones que además de fácil manipulación, fueran susceptibles de fibrilar, aplicando protocolos de estimulación adecuados, y de mantener la arritmia a lo largo del experimento, una vez desencadena. También en ese sentido los conejos de laboratorio poseen corazones en los que se puede conseguir las condiciones que acabamos de comentar. Además, el conejo de laboratorio ha sido considerado ideal para investigar arritmias derivadas de la isquemia y reperfusión (Coker, 1989).

Con respecto a los estudios sobre arritmias y fármacos antiarrítmicos, el corazón de conejo por su tamaño y frecuencia cardíaca basal permite estudiar mejor determinados parámetros electrofisiológicos. Otros modelos, por ejemplo el de ratón, al tener una masa ventricular reducida y una elevada frecuencia cardíaca, junto a una corta duración del potencial de acción limita enormemente el desarrollo del estudio (Riascos *et al.*, 2004). De igual manera, se dificulta el inducir y mantener la FV ya que los circuitos reentrantes que son necesarios para la propagación de la

misma, difícilmente se forman en estos animales (Billman, 2002). Recuérdese el muy bien conocido concepto de Garrey de la “masa crítica” (Garrey *et al.*, 1914, tomado de Jalife, 2000). En este sentido, Garrey establece que la facilidad con la cual el proceso fibrilatorio podría ser inducido y con la cual se recuperaría espontáneamente es inversamente proporcional a la masa del tejido fibrilatorio.

En relación a la manipulación, el corazón de conejo permite un fácil manejo del mismo, tanto para la extracción, así como para la canulación retrógrada en un sistema de perfusión para órgano aislado. Igualmente permite fácilmente observar el recorrido de las coronarias y de esta manera facilita la realización de la oclusión arterial coronaria mediante ligadura. Algunas de estas consideraciones representan una clara ventaja respecto a los corazones de otros animales más pequeños como el de la rata, ratón o cobaya, o mayores, como es el caso del cerdo o del perro (Chorro *et al.*, 2009).

En relación al protocolo de entrenamiento empleado, como hemos comentado en líneas anteriores ya fue aplicado por nosotros en similares trabajos de investigación (Such *et al.*, 2008, Such *et al.*, 2018).

Otras ventajas de este modelo son: fácil cuidado y manejo del animal, la fácil reproducibilidad experimental, su asequibilidad, los bajos costes de su manutención respecto al de otras especies, la experiencia de nuestro grupo en este modelo animal y la adecuación del utillaje tanto quirúrgico como de electroestimulación y registro.

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

Se trata de uno de los mayores avances en relación a la preparación de corazón aislado, en el que Oskar Langendorff en 1985, empleando corazones de mamíferos como conejos, perros y principalmente gatos, realizó una modificación

clave al modelo inicial de corazón aislado de rana, en el que introdujo el concepto de perfusión retrógrada, en el cual se canula la aorta ascendente y se administra el perfundido sérico a una presión hidrostática constante en la raíz aórtica (Langendorff, 1895; citado por Ronglih *et al.*, 2012).

A pesar de este avance, en el que se logra que el corazón perfundido continúe latiendo, se considera que el corazón no realiza un trabajo funcional ya que no expulsa ningún perfundido sérico, puesto que la cámara del ventrículo izquierdo se mantiene esencialmente vacía. Para dar solución a esto, en 1967 James Neely y Howard Morgan realizaron una valiosa modificación al modelo, describiendo una preparación de corazón aislado de rata, en el que se realizaba un trabajo mecánico fisiológicamente válido (Neely *et al.*, 1967; citado por Ronglih *et al.*, 2012).

Gracias al desarrollo de esta técnica, nuestro grupo de investigación ha podido llevar a cabo diversos estudios en corazón aislado, permitiendo analizar mediante sistemas de mapeo eléctrico y más recientemente también mediante mapeo óptico las diferentes propiedades electrofisiológicas en el miocardio, sometido a diferentes tipos de manipulación, ya sea en condiciones normales de oxigenación y perfusión así como en relación a algunas condiciones fisiopatológicas tales como el estiramiento mecánico y su modificación por diferentes fármacos (Del Canto *et al.*, 2018, Such-Miquel. 2018), el síndrome metabólico (Calvo *et al.*, 2019) y el efecto que desencadena la realización de protocolos de ejercicio físico crónico (Such *et al.*, 2008, Zarzoso *et al.*, 2012, Such *et al.*, 2018).

Entre las ventajas del uso de la técnica de Langendorff destaca su alta reproducibilidad, bajo coste y la posibilidad de analizar diversos fenómenos sin la influencia de factores reguladores extrínsecos, como los factores neurohumorales circulantes y las influencias nerviosas centrales. Adicionalmente, permite acceder fácilmente a las zonas de interés y al mismo tiempo mantener el desarrollo del

experimento a pesar de condiciones límite que serían mortales en un estudio *in vivo*, tal como sucede en un paro cardíaco o en la instauración de arritmias letales (Riascos *et al.*, 2004).

En el caso de la fibrilación ventricular, el desencadenamiento de esta, *in vivo*, implica la abolición de la perfusión coronaria, la aparición de isquemia y el deterioro metabólico del miocardio, condiciones que por sí mismas alteran las características del proceso fibrilatorio (Chorro *et al.*, 2002a). Así pues, el uso de preparaciones experimentales, en los que se mantiene la perfusión coronaria constante durante la FV, permiten mantener un estado metabólico adecuado durante la misma y es posible obtener condiciones experimentales estables y fácilmente reproducibles que permiten evaluar los efectos de distintas variables sobre el patrón fibrilatorio ventricular (Chorro *et al.*, 2000b; Chorro *et al.*, 2002a).

Por todo lo anterior, para el desarrollo de este estudio, el uso de esta preparación en corazón aislado de conejo supone así una herramienta básica de gran utilidad al permitir analizar los diversos parámetros de interés empleando sistemas de mapeo eléctrico sobre la pared epicárdica ventricular y de esta manera registrar las señales electrográficas del miocardio tanto en ritmo sinusal como en fibrilación, a la vez que se facilita la administración de la glibenclamida y la libre manipulación del corazón al realizar la oclusión arterial coronaria mediante la ligadura de la misma.

No obstante, esta técnica requiere un estricto control de la temperatura y de la presión de perfusión, puesto que interesa simular, al menos en parte, las condiciones fisiológicas lo más cercano posible a la realidad, y al no existir inervación neurovegetativa sobre el corazón, ni tampoco tener función de bomba (pues en nuestro estudio no hay carga ni postcarga), queda un poco alejado de la fisiología cardíaca normal.

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

En esta investigación, la fibrilación ventricular se induce sin interrumpir la perfusión coronaria, y se ha utilizado como una herramienta metodológica que permite determinar diferentes propiedades electrofisiológicas analizando el comportamiento de la señal en el dominio del tiempo y de la frecuencia (intervalos VV, dispersión de los mismos, percentil 5 de los intervalos que se interpretan como periodo refractario funcional durante la arritmia, concentración espectral, energía normalizada, frecuencia dominante media, máxima y mínima) que nos permiten aproximarnos a los valores de las propiedades como son la refractariedad, la velocidad de conducción (no determinada en la presente tesis y la heterogeneidad electrofisiológica).

El registro de la señal fibrilatoria se realiza mediante un sistema de mapeo eléctrico que, como hemos detallado en Métodos, incorpora una placa de multielectrodos que se acopla a la pared epicárdica ventricular y por lo tanto los datos obtenidos provienen principalmente de esta zona.

Con el propósito de minimizar al máximo los errores o la influencia de la subjetividad en el marcado dependiente del investigador, se acordó definir unos criterios generales de marcado de la señal electrográfica para controlar de manera más rigurosa variables externas que puedan alterar los valores de los parámetros de estudio, y de esta manera lograr estandarizar al máximo posible el proceso de marcado.

Con respecto al análisis de la FV, es posible determinar los tiempos de activación epicárdica tanto en ritmo sinusal como durante la FV, a través de los registros electrográficos obtenidos por medio de la placa multielectrodos. Conocer los tiempos de activación durante la FV ayuda al análisis del proceso de activación

durante la arritmia y de esta manera permite determinar la complejidad de la misma. A través de los registros electrográficos múltiples, es posible analizar las características espectrales de la FV en muy diversos puntos del miocardio ventricular, al igual que realizar el análisis de la señal fibrilatoria en el dominio del tiempo de otros parámetros relacionados con la refractariedad del tejido miocárdico. Esta metodología ha sido frecuentemente usada en los estudios publicados por nuestro grupo.

En el presente estudio, el periodo refractario funcional durante la FV se ha estimado a partir del percentil 5 del histograma de las longitudes de onda (intervalos VV) de la señal fibrilatoria (entre 4000 y 7000 ciclos), asumiendo que en el ciclo más corto de la FV no existe prácticamente “una ventana excitable”. Este método, que permite conocer la refractariedad del tejido, ha sido analizado en diversos estudios metodológicos comparativos (Duytschaever *et al.*, 2001). Por un lado, este método no tiene en cuenta la estimulación externa al corazón, y por otro, permite conocer la capacidad del tejido para conducir frentes de ondas de activación sucesivos, mientras no se halle en periodo refractario funcional. No obstante, el valor obtenido del periodo refractario funcional mediante este método resulta ser significativamente mayor que el que se obtiene por el método del mapeo (Duytschaever *et al.*, 2001).

## **4.2. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y SU SIGNIFICADO**

### **4.2.1. aspecto al periodo refractario funcional previamente a la oclusión arterial coronaria y tras la oclusión**

Como se ha visto anteriormente, la aplicación de un protocolo de entrenamiento físico ha producido periodos refractarios funcionales ventriculares mayores, con respecto a los encontrados en el grupo control, previamente a la oclusión arterial coronaria. El mayor periodo refractario funcional ventricular del grupo entrenado se ha manifestado como vimos en el capítulo de resultados, en los parámetros de refractariedad analizados por nosotros, es decir, tanto en el valor del percentil 5 (estimado como el valor del periodo refractario funcional durante la FV), como en la frecuencia dominante, que de modo paralelo se relaciona con la refractariedad (a menor valor de frecuencia dominante, mayor periodo refractario). Este es un resultado que afianza estudios previos realizados por nuestro grupo y que en realidad son continuación de los que se hicieron hace más de una década y que iban dirigidos a conocer si el ejercicio físico crónico produce modificaciones intrínsecas de las propiedades electrofisiológicas del miocardio como el automatismo la conducción y la refractariedad y que posteriores investigaciones han confirmado (Such *et al.*, 2002; Such *et al.*, 2008, Parra, 2012 y Zarzoso *et al.*, 2012). Con una metodología similar y/o idéntica de corazón aislado, perfundido y fibrilando, para analizar propiedades electrofisiológicas como la refractariedad, Koninkx (2015) y Such-Miquel *et al.* (2018) obtuvieron parecidos resultados. Aunque los mecanismos básicos por los cuales el ejercicio físico crónico ha producido un incremento de la refractariedad, estos no han sido estudiados por nosotros; no obstante, expondremos algunas de las investigaciones básicas que nos permiten plantear algunos de los mecanismos implicados.

Hace ya entre dos y tres décadas se realizaron estudios experimentales en los que se demostró que el ejercicio físico crónico produce un incremento de la duración del potencial de acción (Tibbits *et al.*, 1981; Gwathmey *et al.*, 1990, Jew *et al.*, 2000, Natali *et al.*, 2002) que salvo en el caso del incremento de la refractariedad postpotencial de acción que se produce en el miocardio isquémico (Sutton *et al.* 2000), el incremento en la duración del potencial de acción se corresponde con un incremento similar del periodo refractario. Estudios electrofisiológicos en cardiomiocitos aislados procedentes de animales entrenados, han tratado de investigar la participación de los canales que vehiculan la corriente lenta de entrada de calcio ( $ICa_L$ ) (Mokelke *et al.*, 1997). Tales investigaciones junto con otras más recientes en las que no se observó que los niveles de proteínas del canal tipo L para el  $Ca^{++}$  difirieran entre un grupo de animales control y otro sometido a entrenamiento (da Silva *et al.*, 2017), parecen descartar la participación de las corrientes y canales mencionados en las modificaciones producidas por el entrenamiento.

Asimismo, fueron investigadas las corrientes de salida de potasio (Jew *et al.*, 2001), y el sistema de intercambio Na/Ca (Mace *et al.*, 2003). En lo que respecta a tales corrientes de potasio Jew *et al.* (2001) encontraron, en cardiomiocitos aislados de ventrículo izquierdo de ratas entrenadas, una reducción en la densidad de corrientes repolarizantes de potasio de inactivación lenta o sostenida, a las que ellos y otros autores denominaron  $I_{sus}$  o  $I_{late}$ , y también encontraron un incremento en la rapidez a la cual se alcanza el pico de la corriente  $I_{to}$  y un ligero incremento en la densidad de corrientes  $I_{to}$ . Con respecto al intercambiador Na/Ca, este no parece verse influido por el entrenamiento según las investigaciones realizadas por Mace *et al.* (2003).

El hecho de que, en los corazones de animales entrenados, el periodo refractario ventricular sea mayor que en los corazones de animales del grupo control, previamente a la oclusión coronaria, evidencia una clara protección antiarrítmica. El

aumento del periodo refractario incrementa a su vez el parámetro que llamamos longitud de onda del proceso de activación (resultado del producto del periodo refractario por la velocidad de conducción) cuyo incremento dificulta la instauración de reentradas (Wijffels *et al.*, 1995).

En lo que respecta a los efectos que ha ejercido la administración de glibenclamida, previamente a la oclusión coronaria, dado que este fármaco es un bloqueante de los canales  $K_{ATP}$  y que dichos canales se abren en condiciones de un aumento importante de las demandas de oxígeno o bien cuando disminuye el aporte del mismo, nos hace plantear la posibilidad de que sus efectos sobre el parámetro estudiado en condiciones de normoxia puedan deberse a algún otro mecanismo sobre el que actúe también la glibenclamida. En este sentido, ya Csonka *et al.* (2003) observaron que la glibenclamida ejerció un efecto desfibrilatorio que además iba seguido de una mejor función en el corazón de rata. Algunos años antes Yamazaki y Hume (1997) sugirieron, en base a estudios realizados en cardiomiocitos de cobaya, que la glibenclamida podía ejercer efectos sobre otros canales además de los propios sobre el canal  $K_{ATP}$ .

En lo que respecta a los resultados tras la oclusión arterial coronaria, hemos visto que, en los grupos, control y tratado con glibenclamida aumentó el periodo refractario funcional durante la FV, lo que no ocurrió en el grupo entrenado, que tras la obliteración arterial exhibió el mantenimiento de los valores del percentil 5 similares a los determinados previamente a la oclusión.

Nosotros atribuimos el aumento del periodo refractario funcional durante la FV al mayor deterioro metabólico del grupo control y del tratado con glibenclamida. De hecho, ha sido publicado que la frecuencia dominante de la FV que se correlaciona de modo inverso con la refractariedad, cuando se produce un mayor daño isquémico, éste se corresponde con una frecuencia dominante de la FV menor

(Strohmenger *et al.*, 1997). Por tanto, y pese a que hemos comentado en líneas anteriores que el incremento del periodo refractario lo interpretamos como un efecto beneficioso anti arrítmico, en el miocardio normalmente oxigenado, el alargamiento del mismo en el miocardio isquémico es una manifestación de los efectos deletéreos que suponen la privación de oxígeno y nutrientes, así como del acúmulo de metabolitos de desecho y de alteraciones físico-químicas, y por tanto de la constancia del medio extracelular. Más adelante, en relación con los resultados correspondientes a la frecuencia dominante, insistiremos en este aspecto.

#### **4.2.2. Respecto a la FD de la FV previamente a la OAC**

Como vimos en el apartado de Resultados cuando comparamos la FD de la FV del grupo entrenado con la del control, previamente a la oclusión coronaria, observamos que este parámetro fue menor en el grupo entrenado. Frecuencia dominante y periodo refractario son parámetros muy directamente relacionados, como es sabido; de tal modo que una disminución de la frecuencia de la FV indica un mayor periodo refractario (Chorro *et al.*, 2000). La observación de que el entrenamiento físico puede operar sobre la refractariedad intrínseca del miocardio ventricular, incrementando la misma, y reflejarse este hecho en una disminución de la FD de la FV, ya ha sido publicado por nosotros (Such *et al.*, 2008). Este resultado contribuye a afianzar nuestra hipótesis acerca de que el ejercicio físico crónico produce modificaciones de carácter intrínseco sobre la refractariedad ventricular. Las razones por las que se produce este efecto ya han sido comentadas en publicaciones previas, y están íntimamente relacionadas con las que hemos comentado, líneas arriba, para el caso del periodo refractario funcional o percentil 5 de los intervalos fibrilatorios, razón por la cual no vamos a insistir en este punto.

### 4.2.3. Respecto a la FD de la FV tras la OAC

La caída de la frecuencia de la fibrilación, observada en el grupo control y tratado, tras la oclusión arterial coronaria, que ocurre de modo simultáneo con el alargamiento del periodo refractario funcional, ya hemos comentado que indica un deterioro metabólico del miocardio como también ha sido señalado por autores y que hacen referencia a la caída de las concentraciones de fosfatos de alta energía en el miocardio isquémico en fibrilación (Neumar *et al.*, 1990, citado por Strohmenger *et al.*, 1997). La mejor perfusión miocárdica después de la resucitación cardiopulmonar y la administración de vasopresores, coincide con un incremento en la frecuencia de la FV y una mayor probabilidad de éxito del choque de descarga (Strohmenger *et al.*, 1997). La caída de la frecuencia dominante de la fibrilación en la isquemia es un hecho observado tanto en corazones humanos (Sutton *et al.*, 2000), como experimentalmente (Zaitsev *et al.*, 2003). Contrariamente a lo que acabamos de apuntar para el grupo control y el tratado, en el grupo entrenado, la oclusión coronaria evitó la caída de la frecuencia de la FV en los momentos analizados por nosotros, esto es, al minuto y a los tres minutos, después de la ligadura coronaria, es decir en los momentos más prematuros del proceso isquémico. Como luego veremos en el apartado de limitaciones del estudio, la medida de la FD de la FV a los cinco minutos post-oclusión coronaria presenta incertidumbres metodológicas. Es por eso que nos ha parecido más correcto obviar el dato obtenido en el tiempo que acabamos de mencionar. Estos resultados nos indican que el ejercicio físico crónico ha exhibido un efecto protector, evitando el deterioro metabólico del cardiomiocito, que como parece desprenderse de las investigaciones realizadas, se halla relacionado con las características espectrales de la FV. Es clásica la publicación de una revisión de Scheuer y Tipton (1977), en la que se relata que el contenido de glucógeno cardiaco de un animal entrenado, en reposo es mayor que el de esa misma especie animal, en reposo.

Por otra parte, nos parece, a la vista de los resultados del grupo tratado con glibenclamida, que en lo que respecta al efecto de dicha sustancia sobre la FD de la FV tras la oclusión coronaria, el bloqueo del canal  $K_{ATP}$  no parece apoyar, al menos en este parámetro, la idea de que el ejercicio físico pudiera ejercer su efecto beneficioso a través del bloqueo de dicho canal, al menos en lo que al estatus metabólico se refiere, vista la diferencia que hay entre los resultados correspondientes al grupo entrenado y los correspondientes al grupo tratado. Es por ello que este resultado, a diferencia de otros que veremos más adelante, en cambio parece apoyar la idea de que el ejercicio físico podría operar a través de ejercer un efecto abridor de dicho canal, como se ha publicado en un estudio que indica que el ejercicio o el estrés podrían ser suficientes para activar los canales  $K_{ATP}$  en el corazón (Zingman *et al.*, 2002), y que apoyan multitud de autores que han investigado el efecto protector de la apertura del canal  $K_{ATP}$  sobre el tamaño del infarto que se produce tras la oclusión coronaria (Sanguinetti *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 2009), y su similitud con el efecto que tiene la realización de ejercicio físico crónico. De manera similar y sobre el estatus metabólico como indicador de protección, otras publicaciones apoyan asimismo el efecto protector de los canales  $K_{ATP}$ ; así Gumina *et al.* (2003) estudiando ratones *knockout* Kir6.2, relataron que los canales de  $K_{ATP}$  son esenciales en la protección inducida por el acondicionamiento isquémico de las dinámicas energéticas celulares y en el desempeño cardiaco asociado, basándose en el deterioro metabólico que se producía tras isquemia global y reperfusión posterior. Sobre la base de las anteriores observaciones, y dado el resultado obtenido por nosotros se desprende que el ejercicio físico no ha operado beneficiosamente, al menos en este parámetro, a través del bloqueo del canal  $K_{ATP}$ . Como posibles efectos protectores están los ya clásicamente estudiados que operan sobre el dispositivo metabólico del cardiomiocito y otros efectos más posteriormente investigados y que comentaremos someramente a continuación. Como hemos indicado anteriormente, la actividad de la glucógeno-sintetasa está incrementada en los corazones de animales entrenados físicamente, y después de un episodio de actividad física la cual

reduce el contenido de glucógeno cardíaco, hay una rápida resíntesis de este polisacárido; proceso muy activado en los animales más severamente entrenados. De este modo, durante el entrenamiento físico hay probablemente oscilaciones amplias de las reservas de glucógeno cardíaco con reducciones durante los periodos de ejercicio y una marcada supercompensación durante los periodos de descanso (para revisión ver Scheuer y Tipton, 1977). Similares resultados en los que se ha relatado que corazones de animales entrenados exhibieron mayor reserva de glucógeno en reposo han sido publicados con posterioridad (para revisión ver Powers *et al.*, 2008), con lo que la glicolisis anaeróbica, que comienza y se intensifica en la isquemia miocárdica, puede contribuir como medio eficaz para mantener los niveles de ATP en las primeras fases de este proceso (Carmeliet 1999) y así poder explicar, en parte, el mantenimiento de la frecuencia de la fibrilación tras la oclusión coronaria.

Otros estudios han propuesto diversos mecanismos por los que el ejercicio físico crónico ejerce un efecto beneficioso y de los que en la introducción se realizó algún comentario. Destacan aquellos trabajos en los que se relata la asociación entre ejercicio y cambios en las proteínas implicadas en la homeostasis del calcio (Collins *et al.* 2004). Estos autores, al tiempo que documentaron en ratas hipertensas sometidas a ejercicio físico un aumento en el umbral de la arritmia ventricular, observaron una normalización en la expresión de la proteína fosfolamban, a diferencia de lo que ocurría en las ratas hipertensas sedentarias, así como del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . Otros autores atribuyeron efectos beneficiosos del entrenamiento a un incremento de las proteínas de choque térmico 72 (HSP72) en el miocardio y a las defensas antioxidantes del corazón (Demirel *et al.*, 2001). Adicionales investigaciones han otorgado un papel importante a la producción de óxido nítrico por efecto del ejercicio físico crónico (Hajnal *et al.*, 2005). Asimismo, en trabajos previos, nuestro grupo publicó un incremento en la expresión de óxido nítrico sintasa en conejos sometidos a un protocolo de entrenamiento sobre *treadmill*

(Such *et al.*, 2008). Otros puntos de vista sobre los mecanismos básicos por los que el ejercicio físico ha ejercido un efecto beneficioso incluyen la participación de la activación del megacanal o poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Marcil *et al.*, 2006), a una mejor preservación del flujo coronario (Brown *et al.*, 2003), a una atenuación de la respuesta beta adrenérgica (Billman *et al.*, 2005), y a la mediación de protein-kinasa C (Yamashita *et al.*, 2001).

Además de las anteriores, las posibilidades de cardioprotección propuestas incluyen también un aumento de las proteínas de estrés del retículo endoplásmico, un incremento de la actividad de la 2-ciclooxigenasa, aumento de canales mitoK<sub>ATP</sub>, niveles elevados de canales sarcoK<sub>ATP</sub>, y/o mejoras en las reservas antioxidantes cardíacas, sumado a que los dos últimos han sido considerados como posibles mecanismos protectores (para revisión ver Jew y Moore, 2002).

#### **4.2.4. Respecto a la energía normalizada de la señal fibrilatoria**

Al analizar la homogeneidad espacial de la EN antes de la oclusión, los tres grupos tuvieron un comportamiento muy similar entre ellos. Después de la oclusión, tal y como vimos en el capítulo de resultados, el grupo entrenado mantuvo la energía normalizada, pese a la agresión isquémica, en niveles cercanos a su valor basal, lo que vimos que no ocurrió en el grupo control, en el que disminuyó la EN en el último tiempo de registro, esto es, a los 5 minutos de oclusión. Al parecer estos resultados podrían indicar que los efectos beneficiosos intrínsecos del ejercicio físico crónico afectarían al mantenimiento de la homogeneidad electrofisiológica, ya que la energía normalizada es, de alguna manera, un parámetro relacionado con la regularidad de la señal y por tanto un indicador de heterogeneidad. Vimos asimismo en el capítulo de resultados que se observó un comportamiento muy homogéneo en el grupo tratado con glibenclamida, ya que el parámetro analizado se mantuvo sin variación a lo largo del tiempo de oclusión arterial coronaria. Creemos que el resultado obtenido en los

corazones de los animales entrenados podría estar mediado en parte, por el bloqueo de los canales de  $K_{ATP}$ , dada la similitud en el comportamiento de los corazones de los grupos entrenado y tratado con glibenclamida, tras isquemia regional aguda.

#### **4.2.5. Respecto a la energía mínima necesaria para interrumpir el proceso fibrilatorio en el miocardio isquémico**

Como se ha observado con anterioridad, en los animales entrenados se ha requerido más de un intento de estimulación ventricular a frecuencias crecientes para desencadenar la FV, lo que nos indica claramente una “cardioprotección” del tejido para desarrollar este tipo de alteraciones. Esto puede estar relacionado con otros parámetros como la refractariedad y sobre todo la heterogeneidad, previamente discutidos. Es por esto que hemos pretendido analizar si al igual que el corazón entrenado exhibe una “resistencia” para desarrollar la FV, este exhibe también de cierto modo una “disposición” a la desfibrilación.

En nuestro estudio hemos encontrado que los corazones entrenados requirieron menor cantidad de energía para revertir el proceso fibrilatorio, tras la oclusión arterial coronaria, lo que nos indica claramente que los corazones de este grupo presentaban mayor facilidad de desfibrilación, comparado con el grupo control. Por otra parte, se observa también que el grupo de corazones que fue tratado con glibenclamida también presentó una mayor facilidad desfibrilatoria al compararlo con el grupo control. Esto podría indicar que el bloqueo de los canales de  $K_{ATP}$  podría ser el medio por el cual el ejercicio físico crónico ejerce su efecto beneficioso sobre la mayor facilidad para desfibrilar. Aunque se han realizado diversos estudios al respecto, los mecanismos involucrados en la desfibrilación han sido discutidos por multitud de investigadores (Chen *et al.*, 1998; Dillon *et al.*, 1998; Efimov *et al.*, 1998; Chattipakorn *et al.*, 2001), y por un lado se ha publicado que el resultado de la desfibrilación no depende de la repolarización creada por el choque

eléctrico (Chattipakorn *et al.*, 2001), y por otro, que la desfibrilación exitosa estaría relacionada con la capacidad de la descarga para prolongar el sincronismo y disminuir la dispersión de la repolarización (Dillon 1992, Knisley *et al.*, 1992). Maharaj *et al.*, 2008 publicaron la implicación de la heterogeneidad ventricular transmural en la vulnerabilidad cardíaca a las descargas eléctricas. En base a esto, es posible que nuestros resultados sobre la facilidad para desfibrilar puedan estar relacionados con los efectos que ejerce el ejercicio físico crónico sobre la heterogeneidad del tejido miocárdico y sobre modificaciones electrofisiológicas más recientemente estudiadas en relación con la duración del potencial de acción y refractariedad y otras propiedades, velocidad de conducción y longitud de onda del proceso de activación eléctrica del miocardio y ligadas a la mayor o menor facilidad para la instauración de arritmias que amenazan la vida (Natali *et al.*, 2002, Hajnal *et al.*, 2005, Such *et al.*, 2008, Billman, 2009, Parra 2012 Such-Miquel *et al.*, 2018).

El hecho de que hayamos encontrado que la energía para desfibrilar mediante la aplicación de choques de ondas bifásicas ha sido menor en los grupos entrenado, pero también y de un modo muy similar en los corazones tratados con glibenclamida lleva a pensar que desde el punto de vista del comportamiento de los corazones procedentes de animales entrenados, en este aspecto electrofisiológico, parecen estar sometidos a un bloqueo de los canales  $K_{ATP}$ .

Para proceder a la discusión de este apartado, situaremos la presente observación en el contexto de las investigaciones que pretenden dilucidar los mecanismos por los que el entrenamiento físico aerobio proporciona un efecto protector cardiovascular a fuer de repetir algunas investigaciones que hemos tratado con mayor detalle en apartados anteriores, para más adelante centrarnos en las investigaciones sobre el papel del canal  $K_{ATP}$  como el mecanismo, o uno de los principales mecanismos, sobre los que se asienta el efecto protector del ejercicio físico crónico.

Como sabemos la muerte súbita de origen cardiaco es debida a la instauración de taquiarritmias ventriculares de las que la fibrilación ventricular es con mucho la más frecuente (para revisión ver Billman, 2009) pero la mayor parte de los autores coinciden en que los mecanismos precisos por los que el ejercicio físico crónico ejerce dicho efecto protector no se hallan totalmente dilucidados en la actualidad (Hamer y Stamatakis, 2008, Powers y col., 2014). Si bien el ejercicio físico regular puede operar favorablemente, a pesar de que son varios los factores sobre los que el ejercicio físico puede operar, como son síndrome metabólico, la reducción de la obesidad, la reducción de la incidencia de la diabetes no dependiente de insulina, la disminución de la presión arterial, la mejora de la perfusión miocárdica, el aumento de la actividad fibrinolítica del plasma y la alteración del perfil lipídico en sangre (para revisión ver Billman, 2002, Pinckard *et al.*, 2019) el ejercicio físico regular puede reducir la mortalidad cardiovascular aún en ausencia de efectos sobre los factores que acabamos de citar (Billman, 2002). Los mecanismos fisiológicos por los que el ejercicio puede reducir el riesgo cardiovascular son complejos y no bien comprendidos (Haus y Hill, 2019). Cabe destacar como mecanismos básicos protectores postulados, el aumento de la actividad parasimpática (para revisión ver Billman *et al.*, 2009), la normalización en la expresión de las proteínas implicadas en la homeostasis intracelular de calcio, previamente alteradas (Collins y col. 2005), el aumento tanto de las proteínas de choque térmico HSP72, así como de las defensas antioxidantes cardiacas (Hamilton *et al.*, 2001, Powers *et al.*, 2014), la reducción de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial sensible al calcio, en presencia de sustratos del complejo II (Marcell *et al.*, 2006), las adaptaciones funcionales de la circulación coronaria observadas por la realización regular de ejercicio físico aerobio (Laughlin *et al.*, 2012), si bien algunos de estos mecanismos fueron puestos en cuestión o incluso desechados (para revisión ver Powers *et al.*, 2014). Más recientes investigaciones enfocaron como mecanismo básico desencadenado por el ejercicio físico a los microRNAs, como respuesta del corazón a situaciones de estrés como el

ejercicio físico (Liu *et al.*, 2017) a quienes se atribuyen un papel muy importante para promover efectos cardioprotectores sobre el crecimiento fisiológico (Fernandes y cols., 2015). También se ha encontrado en numerosos estudios en humanos, que el mecanismo protector del ejercicio físico está relacionado con la disminución de la inflamación crónica y la producción de mediadores inflamatorios, y junto a otros estudios en animales, se ha encontrado que disminuye el riesgo de desarrollar una enfermedad crónica a través de la modificación del sistema inmune (Chuong *et al.*, 2019). En el caso de los corazones que han sufrido algún infarto, se ha observado que las vesículas extracelulares, y en especial los exosomas, poseen moléculas claves y participan en la comunicación célula a célula, por medio de la liberación de diversos factores cardioprotectores, lo cual podría constituir una nueva diana para el estudio de los mecanismos beneficiosos inducidos por el ejercicio (Guo *et al.*, 2020).

En el presente trabajo queremos contrastar el resultado que hemos comentado en este apartado, en que el bloqueo del canal con glibenclamida ha ejercido un claro efecto protector antiarrítmico, frente a todos aquellos trabajos de investigación en los que se otorga un efecto protector cardiovascular al ejercicio físico crónico por actuar a través de incrementar la corriente vehiculada por el canal  $K_{ATP}$ , bien sea por aumento de la expresión del mismo, bien a la activación por cualquier otro mecanismo. Efectivamente hemos visto anteriormente que la mayor parte de los autores, sino todos, responsabilizan a una acción del mencionado canal como una de las bases de la protección por el entrenamiento físico (para revisión ver Powers *et al.*, 2013, Such *et al.*, 2015). Sabemos por investigaciones ya realizadas hace algunos años que el ejercicio físico crónico ejerce un claro efecto protector antiarrítmico (Collins *et al.*, 2005, Billman, 2009, Román Campos *et al.*, 2012, Dor-Haim *et al.*, 2013), por tanto, el responsabilizar a la apertura de los canales  $K_{ATP}$  del efecto protector del ejercicio físico, contrasta con que la mayor parte de los autores consultados por nosotros (aunque no todos) y observaciones realizadas por nuestro grupo atribuyen a la apertura del canal  $K_{ATP}$  un efecto claramente arritmogénico.

Efectivamente la mayoría de los estudios realizados hace ya una década, indicaron que la activación farmacológica de  $K_{ATP}$  promueve promueve arritmias ventriculares re-entrantes que amenazan la vida, mientras que el bloqueo del canal durante la isquemia-reperusión disminuye la incidencia de de las arritmias citadas y en general, la activación de  $K_{ATP}$  parece más bien pro arrítmica (para revisión ver cita de Flagg *et al.*, 2010).

Ciertamente, en la isquemia, el acortamiento de la duración del potencial de acción debido al aumento de la corriente  $K_{ATP}$ , al acortar la meseta disminuye la entrada de calcio en le citosol del cardiomiocito, lo cual preserva hasta cierto punto las reservas de ATP disminuyendo el gasto del mismo en lo que se refiere a trabajo mecánico y a trabajo químico de restitución del calcio mediante el transporte activo, todo lo cual reduce la magnitud de la lesión isquémica tal y como ha sido publicado desde hace ya algunos años (Brown *et al.*, 2003). Basándose en que la apertura del canal  $K_{ATP}$  reduce el tamaño del infarto, algunos autores infieren que al reducir el tamaño de la lesión isquémica se reduce la posibilidad de aparición de arritmias. Ante tales afirmaciones planteamos dos evidencias: que sigue asentándose por parte de la mayoría de los autores que la apertura del canal  $K_{ATP}$  es arritmogénica y que es un hecho comúnmente observado que tamaños de infarto relativamente menores que otros pueden desencadenar arritmias letales, que con infartos mayores pueden no aparecer, pese a un mayor deterioro mecánico.

Por tanto, dadas las observaciones comentadas y nuestros resultados al respecto de este apartado, debería buscarse una explicación que permitiera casar que el ejercicio físico protege frente al desencadenamiento de arritmias letales por re-entrada y en cambio, tal y como se postula, la protección ejercida por el mismo se debe a la mayor actividad, por uno u otro mecanismo, de la corriente vehiculada por el canal  $K_{ATP}$ .

#### **4.2.6. Respecto al cronotropismo sinusal.**

Aunque no ha sido propiamente un objetivo del presente trabajo, el efecto de la aplicación del protocolo de ejercicio sobre la cinta, en el corazón aislado de los conejos, sobre el aumento respecto al control que ha producido en la longitud del ciclo sinusal básico ( $p = 0,054$ ), como parámetro de automatismo o cronotropismo, sí que ha sido un resultado obtenido y que contribuye a reforzar una observación similar a la realizada por nuestro grupo investigador en trabajos previos (Such *et al.*, 2002, 2008, Such-Miquel *et al.*, 2018).

El aumento de la longitud del ciclo sinusal es una manifestación electrofisiológica de entrenamiento. Los resultados sobre el automatismo sinusal, contribuyen a reforzar la idea de que el entrenamiento provoca cambios intrínsecos de dicha propiedad, ya que los observamos en un corazón aislado y por lo tanto no sometido a influencias nerviosas centrales, ni tampoco a influencias humorales.

El componente intrínseco de la bradicardia debido al ejercicio físico crónico, aunque no ha sido investigado por nuestro grupo de investigación, ha sido relacionado con un agrandamiento cardiaco y con el estiramiento tónico del nodo sinusal; también han sido sugeridos una modificación en el metabolismo de los miocitos y en algunos casos, que la bradicardia podría estar en relación con el síndrome de la enfermedad del seno (para revisión ver Such *et al.*, 2002).

Aunque en el grupo tratado con glibenclamida la longitud del ciclo sinusal se alejó algo más de la significación estadística respecto al grupo control ( $p = 0,07$ ), sí podemos referir una tendencia, pero en nuestra opinión no relacionada con el efecto de este fármaco sobre el canal  $K_{ATP}$ , ya que fisiológicamente tal canal ya se halla bloqueado y solamente se abren en circunstancias como la isquemia. Cabe la posibilidad de que este efecto pueda deberse a alguna otra acción que pueda exhibir la glibenclamida.

#### **4.2.7. Respecto al desarrollo de desfibrilaciones espontáneas**

Farid *et al.* (2011), publicaron un estudio realizado en 15 corazones de humanos, explantados de pacientes con miocardiopatía dilatada, y que fueron perfundidos mediante la técnica de Langendorff, en el que encontraron que el bloqueo de los canales de  $K_{ATP}$  mediante el uso de glibenclamida, inducía desfibrilación espontánea, por disminución de la heterogeneidad espacial de la refractariedad inducida por isquemia, y que dicho comportamiento desfibrilatorio sucedía de manera prematura. Estos hallazgos, coinciden claramente con lo encontrado en nuestro estudio en el grupo de corazones de conejo tratados con glibenclamida, en donde el 31 % de los corazones desfibrilaron espontáneamente y además presentaron el mayor número de desfibrilaciones de manera espontánea, mostrando diferencias significativas con respecto a los grupos control y entrenado.

#### **4.2.8. Respecto a la recurrencia de eventos fibrilatorios ventriculares tras la desfibrilación**

Alcaraz *et al.* (2011), en un estudio con pacientes que sufrían de fibrilación auricular, demostraron que quienes presentaban una frecuencia dominante baja, se asociaban a longitudes de ciclo auricular más largas y, por lo consiguiente, a un

menor número de reentradas simultáneas. Contrariamente, presentaron frecuencias dominantes más altas los pacientes con longitudes del ciclo auricular más cortas y con un mayor número de frentes de onda simultáneos. Según nuestras observaciones, el grupo entrenado ha mostrado claramente, antes de la oclusión arterial coronaria, características que podrían estar relacionadas con un menor desarrollo de reentradas, al presentar una baja frecuencia dominante de la FV y una longitud del ciclo fibrilatorio (en nuestro caso ventricular) mayor lo que puede haber influido en la reinstauración de la arritmia.

### **4.3. CONSIDERACIONES FINALES RESPECTO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS**

La aplicación del protocolo de entrenamiento ha demostrado exhibir efectos electrofisiológicos beneficiosos de carácter anti arrítmico, tanto en situación de perfusión normalmente oxigenada como tras oclusión arterial coronaria, manteniendo la perfusión global. El aumento de la refractariedad, analizada a través de la determinación de parámetros directos e indirectos de la propiedad mencionada, en situación de normoxia se puede interpretar como un efecto electrofisiológico antiarritmogénico como es clásicamente conocido; y el mantenimiento de la refractariedad en las fases más prematuras de isquemia es expresión, en parte, de un mejor mantenimiento de la condición morfofuncional del cardiomiocito. La menor energía necesaria para desfibrilar a los corazones, ha sido la observación, quizá más relevante, que afianza a la realización de ejercicio físico crónico como maniobra que puede prevenir arritmias letales o facilitar la reversión de las mismas.

En relación al papel que ha podido jugar la corriente vehiculada por el canal  $K_{ATP}$ , hemos visto que el bloqueo de la misma con glibenclamida ha sugerido la posibilidad de emparejar al grupo tratado con este fármaco con el grupo entrenado. Si bien el bloqueo con glibenclamida exhibió un signo, a nuestro parecer, de

deterioro metabólico, manifestado por un alargamiento de la refractariedad durante la fase isquémica, lo que sitúa al bloqueo del canal dando una respuesta contraria a la del entrenamiento físico, sin embargo, el resultado, especialmente relevante, en el que la energía a aplicar para desfibrilar es prácticamente la misma en los grupos tratado y entrenado acerca al mecanismo bloqueante del canal  $K_{ATP}$  a ser el mecanismo por el que el ejercicio físico ejerce su efecto protector anti arrítmico. Se plantea así una cuestión que debe investigarse para asentar, como la mayor parte de los grupos de investigación postulan, que el ejercicio físico ejerce su efecto protector “abriendo” el canal  $K_{ATP}$ .

Contribuimos, además, a asentar que las modificaciones electrofisiológicas que ejerce el ejercicio físico crónico son, también, de carácter intrínseco, ya que se han manifestado en el corazón aislado y por tanto no sujeto a influencias nerviosas centrales, ni humoro-hormonales, ya que no se halla interconectado con los demás tejidos, órganos y sistemas, a través de la sangre circulante.

#### **4.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Para finalizar esta discusión, es importante que planteemos algunas de las limitaciones que se encontró en el desarrollo de este estudio. Por una parte, con respecto al protocolo de entrenamiento físico, aunque ha demostrado ser efectivo al producir ciertas adaptaciones fisiológicas a nivel del corazón, como las que producen los entrenamientos de resistencia aeróbica, no se ha caracterizado la intensidad del entrenamiento según los niveles de consumo de oxígeno ( $VO_{2max}$ ) de los animales. De esta manera se conseguiría desarrollar un método mucho más riguroso y que permitiría avanzar en otro tipo de investigaciones realizadas con esta especie animal.

Por otro lado, en relación al sistema de registro empleado, debido a la configuración de la placa multielectrodo, se hace difícil que el acople corazón-

multielectrodo pueda ser total u óptima en algunos de los casos estudiados, que como ya comentamos antes, esto podría aumentar el nivel de error en los registros por aumentar el ruido o por interferencias en la captura de la señal fibrilatoria debida al desacople entre ambos elementos. El análisis de las características espectrales de la señal fibrilatoria en el dominio del tiempo requiere de una especial atención durante el proceso de marcado manual de las despolarizaciones, pues a pesar que se emplea un sistema de marcado semiautomático que detecta la máxima pendiente negativa ( $dv/dt$ ) en cada tramo del trazado, frecuentemente y pese a los rigurosos controles durante los registros de la señal, no se logran obtener trazados totalmente libres de ruido, interferencias o lo que también suele suceder trazados de muy poca amplitud ocasionados generalmente por un desacople entre la placa de multielectrodos y la pared epicárdica ventricular.

De igual manera, al ser un sistema que recoge la actividad eléctrica de la capa más externa del corazón, dificulta hacer un análisis más exhaustivo de lo que sucede realmente en el resto del miocardio, esto es, en el subendocardio y en el mesocardio; pues la fibrilación ventricular es un fenómeno complejo que ocurre a nivel de todas las capas del tejido cardiaco, es decir en un medio tridimensional (Chorro *et al.*, 2000b) y que su señal electrográfica está caracterizada por presentar multitud de ondas irregulares en morfología, voltaje y frecuencia (Jalife, 2006).

Es por alguna de las consideraciones realizadas que con el fin de evitar las situaciones mencionadas derivadas del desacople del corazón con la placa multielectrodos, sería un avance importante si se lograra desarrollar una especie de funda o malla de registro cardíaco, que permita efectuar el mapeo eléctrico sin interferir con todos los demás procesos llevados a cabo durante el registro electrofisiológico y que, además permitiese detectar a su vez la actividad eléctrica de otras capas más profundas.

Sobre el sistema de perfusión para el corazón aislado, es necesario decir que, aunque el usado en este estudio (Langendorff) permitió analizar las características electrofisiológicas del corazón *in vitro*, no deja de ser interesante desarrollar estos experimentos en un modelo de estudio, que permita el análisis electrofisiológico con el corazón trabajando de manera funcional (*working heart*), consiguiendo así unas condiciones más similares a las fisiológicas.

En relación al método usado para la realización del análisis espectral de la fibrilación ventricular presenta un inconveniente y es que determina unas variaciones en la frecuencia dominante, en nuestro caso en situación de isquemia regional que a partir de un tiempo deja de reflejar la modificación fisiopatológica de la excitabilidad miocárdica producida. En concreto, la frecuencia de la fibrilación, tras la oclusión arterial coronaria, comienza a disminuir, lo cual se corresponde con el incremento de la refractariedad propia de la isquemia; sin embargo, nuestro método de análisis espectral a partir de un momento (aproximadamente 180 segundos), comienza el proceso de disminución frecuencial y se sitúa en valores previos a la oclusión a los 5 minutos de la interrupción del flujo coronario. Es por eso que hemos decidido analizar la frecuencia en los momentos más prematuros tras el inicio de la agresión isquémica, que en cualquier caso es la fase más peligrosa desde el punto de vista de la arritmogénesis en esta situación fisiopatológica.

El análisis de la fibrilación en el dominio de la frecuencia para la determinación de la frecuencia dominante media del trazado fibrilatorio está sujeto a modificaciones dependientes de una serie de factores como son la interferencia debida a los potenciales o campos lejanos, el “ruido”, la ratio trazado fibrilatorio normal ruido, la duración del trazado fibrilatorio, que ha llevado desde hace más de una década, a los diferentes autores, a enfatizar sobre la necesidad de una cuidadosa evaluación de las señales y al uso de técnicas de procesamiento robustas (N.G. *et al.*, 2007).



## **5. CONCLUSIONES**

---



## 5. CONCLUSIONES

En la presente tesis ha sido realizada una investigación, en corazón aislado de conejo, perfundido y en fibrilación ventricular (sin interrumpir la perfusión), acerca de los efectos del ejercicio físico crónico sobre diversos parámetros electrofisiológicos relacionados con la refractariedad, en situación de normoxia y tras isquemia regional aguda y sobre la energía necesaria para revertir el proceso fibrilatorio ventricular mediante la aplicación de choques eléctricos de ondas bifásicas tras isquemia regional aguda. Esta investigación ha sido realizada en corazones procedentes animales control, animales entrenados y en corazones sometidos a perfusión con un bloqueante del canal  $K_{ATP}$ , la glibenclamida, con la finalidad de analizar las similitudes o por el contrario discrepancias entre las respuestas de los corazones de animales entrenados y aquellos sometidos a bloqueo del canal  $K_{ATP}$ . De los resultados y su análisis podemos concluir que:

1. El efecto beneficioso del ejercicio físico crónico sobre la instauración de arritmias que amenazan la vida podría ser debido, al menos en parte, al incremento de la refractariedad miocárdica ventricular intrínseca, dado su efecto sobre los parámetros relacionados con esta propiedad: aumento del periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular (percentil 5 de los intervalos fibrilatorios) y disminución de la frecuencia dominante de la arritmia.
2. El mantenimiento de los valores de los parámetros de refractariedad mencionados tras la oclusión coronaria, en las fases más prematuras de la isquemia, en el caso de los corazones de animales entrenados, contribuye a asentar que el ejercicio físico crónico parece mantener mejor el estatus metabólico de los cardiomiocitos.

3. Las modificaciones de los parámetros de refractariedad que indican un alargamiento de dicha propiedad tras la oclusión coronaria, observado en los corazones tratados con glibenclamida, parecen descartar la idea de que el ejercicio físico ejerce sus efectos beneficiosos a través del bloqueo del canal, lo que apoya la idea claramente más extendida de que incrementa la corriente vehiculada por el canal  $K_{ATP}$ .
4. El ejercicio físico crónico ejerce un efecto protector antiarrítmico manifestado en nuestro estudio por el menor requerimiento de energía para revertir la fibrilación mediante choques.
5. La similitud de repuesta de los corazones tratados con glibenclamida y los procedentes de conejos entrenados, en lo que respecta al umbral desfibrilatorio cuando aplicamos choques eléctricos, hace pensar, contrariamente a lo expuesto en la conclusión tercera, que el ejercicio físico parece operar, en este aspecto y contrariamente a lo establecido por la casi totalidad de autores, a través del bloqueo del canal  $K_{ATP}$ .
6. La anterior conclusión plantea la necesidad de responder a la cuestión: si la protección exhibida por el ejercicio físico crónico, opera a través de mecanismos que implican un incremento de la corriente vehiculada por el canal  $K_{ATP}$ , que en opinión de la mayor parte de autores es arritmogénica, ¿cómo explicar que el ejercicio que exhibe protección antiarrítmica, hallada también en la presente investigación, lo hace a través de incrementar la corriente vehiculada por el mencionado canal?

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



- **Aguilar-Bryan L. y Bryan J.** (1999). Molecular biology of adenosina triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine Reviews*, 20, 101-35. DOI: [10.1210 / edrv.20.2.0361](https://doi.org/10.1210/edrv.20.2.0361).
- **Alcaraz R., Hornero F., y Rieta J.J.** (2011). “Noninvasive time and frequency predictors of longstanding atrial fibrillation early recurrence after electrical cardioversion,” *PACE - Pacing Clin. Electrophysiol.*, 34(10), pp. 1241–1250.
- **Ali A., Mehra M., Malik F., Lavie C.J., Bass D., y Milani R.V.** (1999). Effects of aerobic exercise training on indices of ventricular repolarization in patients with chronic heart failure. *Chest*, 116, 83–87. DOI: [10.1378/chest.116.1.83](https://doi.org/10.1378/chest.116.1.83).
- **Alves da Silva C.S.** (2015). Estudio comparativo de los efectos electrofisiológicos miocárdicos intrínsecos de la apertura del canal  $K_{ATP}$  y del ejercicio físico crónico, en situación de normoxia y tras isquemia regional aguda. Estudio experimental (tesis doctoral). Universitat de València, Valencia.
- **Antzelevitch C., Sicouri S., Litovsky S.H., Lukas A., Krishnan S.C., Di Diego J.M., Gintant G.A., y Liu D-W.** (1991). Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circulation Research*, 69, 1427-49. DOI: [10.1161/01.RES.69.6.1427](https://doi.org/10.1161/01.RES.69.6.1427).
- **Arena J.P. y Kass R.S.** (1989). Enhancement of potassium-sensitive current in heart cells by pinacidil: Evidence for modulation of the ATP-sensitive potassium channel. *Circulation Research*, 65(2), 436-445. DOI: [10.1161/01.RES.65.2.436](https://doi.org/10.1161/01.RES.65.2.436).
- **Ascensão A., Ferreira R. y Magalhães J.** (2007). Exercise-induced cardioprotection - biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *International Journal of Cardiology*, 117(1), 16–30. DOI: [10.1016 / j.ijcard.2006.04.076](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.04.076).

- **Ashcroft S.J.H. y Ashcroft F.M.** (1990). Properties and functions of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Cellular Signalling*, 2(3), 197-214. DOI: [10.1016/0898-6568\(90\)90048-F](https://doi.org/10.1016/0898-6568(90)90048-F).
- **Babai L., Szigeti Z., Parratt J. R., y Végh, A.** (2002). Delayed cardioprotective effects of exercise in dogs are aminoguanidine sensitive: possible involvement of nitric oxide. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 102(4), 435–445. PMID: 11914106.
- **Barbuti A., Baruscotti M., y DiFrancesco D.** (2007). The pacemaker current. *Journal Cardiovascular Electrophysiology*, 18(3), 342-347. DOI: [10.1111/j.1540-8167.2006.00736.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2006.00736.x).
- **Bartels R., Menges M., y Thimme W.** (1997). Effect of physical activity on incidence of sudden cardiac death. Study of the Berlin-Reinickendorf and Berlin-Spandau population. *Medizinische Klinik*, 92(6), 319–325. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9297062>.
- **Batsford W.P., Cannom D.S. y Zaret B.L.** (1978). Relations between ventricular refractoriness and regional myocardial blood flow after acute coronary occlusion. *American Journal of Cardiology*, 41(6), 1083–1088. DOI: [10.1016/0002-9149\(78\)90861-5](https://doi.org/10.1016/0002-9149(78)90861-5).
- **Benito L., Hoyo J., Montroig A., Fornés B., Fluxà G., Martí D., Pedrós M., Sisó A., Mont L., Miró O., y Coll-Vinent B.** (2011). Adverse effects of antiarrhythmic drugs in patients with atrial fibrillation in primary care. *Med Clin (Barc)*. 10, 137(6), 241-246. DOI: [10.1016/j.medcli.2010.06.034](https://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.06.034).
- **Berlin J.A., y Colditz G.A.** (1990). A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *American Journal of Epidemiology*, 132(4), 612–628. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2144946>.
- **Bernardo, B.C., Ooi, J.Y.Y., Weeks, K.L., Patterson, N.L., McMullen, J.R.** (2018). Understanding key mechanisms of exercise-induced cardiac

protection to mitigate disease: current knowledge and emerging concepts. *Physiological Reviews*, 98,419–475. DOI: [10.1152/physrev.00043.2016](https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2016).

- **Bers D.M.** (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual Review of Physiology*, 70, 23–49. DOI: [10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455).
- **Billman G.E., Schwartz P.J., y Stone H.L.** (1984). The effects of daily exercise on susceptibility to sudden cardiac death. *Circulation*, 69(6), 1182–1189. DOI: [10.1161/01.CIR.69.6.1182](https://doi.org/10.1161/01.CIR.69.6.1182).
- **Billman G.E.** (1994). Role of ATP sensitive potassium channel in extracellular potassium accumulation and cardiac arrhythmias during myocardial ischaemia. *Cardiovascular Research*, 28(6), 762-769. DOI: [10.1093/cvr/28.6.762](https://doi.org/10.1093/cvr/28.6.762).
- **Billman G.E.** (2002). Aerobic exercise conditioning: a nonpharmacological antiarrhythmic intervention. *Journal of Applied Physiology*, 92(2), 446-454. DOI: [10.1152/jappphysiol.00874.2001](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00874.2001).
- **Billman G.E.** (2006). A comprehensive review and analysis of 25 years of data from an in vivo canine model of sudden cardiac death: implications for future anti-arrhythmic drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(3), 808– 835. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2006.01.002](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.01.002).
- **Billman G.E., Kukielka M., Kelley R., Moustafa-Bayoumi M., y Altschuld RA.** (2006). Endurance exercise training attenuates cardiac beta2-adrenoceptor responsiveness and prevents ventricular fibrillation in animals susceptible to sudden death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 290(6), H2590-9. DOI: [10.1152/ajpheart.01220.2005](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01220.2005).
- **Billman G.E., y Kukielka M.** (2007). Effect of endurance exercise training on heart rate onset and heart rate recovery responses to submaximal exercise in animals susceptible to ventricular fibrillation *Journal of Applied Physiology*, 102(1), 231-240. DOI: [10.1152/jappphysiol.00793.2006](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00793.2006).

- **Billman G.E., Kukielka M., y Carnes C.A.** (2007). Effects of endurance exercise training on ischemically induced changes in the T-wave and susceptibility to ventricular fibrillation (Abstract). *European Heart Journal*, 28, 35-35. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/296111894\\_Effect\\_of\\_endurance\\_exercise\\_training\\_on\\_ischemically\\_induced\\_changes\\_in\\_the\\_T-wave\\_and\\_susceptibility\\_to\\_ventricular\\_fibrillation](https://www.researchgate.net/publication/296111894_Effect_of_endurance_exercise_training_on_ischemically_induced_changes_in_the_T-wave_and_susceptibility_to_ventricular_fibrillation)
- **Billman G.E.** (2008). The cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel as a novel target for anti-arrhythmic therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 120(1), 54-70. DOI: [10.1016 / j.pharmthera.2008.07.004](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.07.004).
- **Billman G.E.** (2009). Cardiac autonomic neural “remodelling” and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 297(4), 1171-1193. DOI: [10.1152 / ajpheart.00534.2009](https://doi.org/10.1152 / ajpheart.00534.2009).
- **Blair S.N., Kampert J.B., Kohl H.W. 3ro, Barlow C.E., Macera C.A., et al.** (1996). Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *The Journal of the American Medical Association*, 276(3), 205–210. DOI: [10.1001 / jama.1996.03540030039029](https://doi.org/10.1001 / jama.1996.03540030039029).
- **Bloor C.M., Pasyk S., y Leon A.S.** (1970). Interaction of age and exercise on organ and cellular development. *American Journal of Pathology*, 58, 185-199.
- **Boineau J.P., y Cox J.L.** (1973). Slow ventricular activation in acute myocardial infarction: A source of re-entrant premature ventricular contractions. *Circulation*, 48, 702-713. DOI: [10.1161 / 01.CIR.48.4.702](https://doi.org/10.1161 / 01.CIR.48.4.702).
- **Bolli R., Becker L., Gross G., Mentzer R., Jr., Balshaw D., y Lathrop D.A.** (2004). Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circulation Research*, 95(2), 125-134. DOI: [10.1161 / 01.RES.0000137171.97172.d7](https://doi.org/10.1161 / 01.RES.0000137171.97172.d7).

- **Bonilla I.M., Belevych A.E., Sridhar A., Nishijima Y., Ho H.T., He Q., Kukielka M., Terentyev D., Terentyeva R., Liu B., Long V.P., Györke S., Carnes C.A., y Billman G.E.** (2012). Endurance exercise training normalizes repolarization and calcium-handling abnormalities, preventing ventricular fibrillation in a model of sudden cardiac death. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.:1985)*, 113(11), 1772–1783. DOI: [10.1152/jappphysiol.00175.2012](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00175.2012).
- **Brown D.A., Jew K.N., Sparagna G.C., Musch T.I., y Moore R.L.** (2003). Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *Journal of Applied Physiology (1985)*, 95(6), 2510–2518. Epub 2003. DOI: [10.1152/jappphysiol.00487.2003](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00487.2003).
- **Brown D.A., Chicco A.J., Jew K.N., Johnson M.S., Lynch J.M., Watson P.A., y Moore R.L.** (2005). Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the  $K_{ATP}$  channel in the rat. *The Journal of Physiology*, 569(3), 913–924. DOI: [10.1113/jphysiol.2005.095729](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.095729).
- **Buja, L.M.** (2013). The pathobiology of acute coronary syndromes: clinical implications and central role of the mitochondria. *Texas Heart Institute Journal*, 40(3), 221–228. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23914009>.
- **Calvo C.J., Lozano W.M., Arias-Mutis Ó.J., Such-Miquel L., Such L., Genovés P., Guill A., Millet J., Chorro F.J., Alberola A., Pandit S.V. y Zarzoso M.** (2019) Modifications of short-term intrinsic pacemaker variability in diet-induced metabolic syndrome: a study on isolated rabbit heart. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 75(2), 173-183. DOI: [10.1007/s13105-019-00667-7](https://doi.org/10.1007/s13105-019-00667-7).
- **Capucci A., Coronel R., Fabius M. A. W., y Janse M. J.** (1995). Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias in acute ischemia: further observations. *New Trends Arrhythmias*, 1, 41–56

- **Carew T.E., y Covell J.W.** (1978). Left ventricular function in exercise-induced hypertrophy in dogs. *American Journal of Cardiology*, 42, 82-88.
- **Carmeliet E.** (1978). Cardiac transmembrane potentials and metabolism. *Circulation Research*, 42, 577-587. DOI: [10.1161/res.42.5.346251](https://doi.org/10.1161/res.42.5.346251)
- **Carmeliet E., y Mubagwa K.** (1998). Antiarrhythmic drugs and cardiac ion channels: mechanisms of action. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 70(1), 1-72. DOI: [10.1016/S0079-6107\(98\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00002-9).
- **Carmeliet E.** (1999). Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiological Review*, 79(3), 917-1017. DOI: [10.1152/physrev.1999.79.3.917](https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.917).
- **Chattipakorn N., Banville I., Gray R.A., Ideker R.E.** (2001). Mechanism of ventricular defibrillation for near-defibrillation threshold shocks: a whole-heart optical mapping study in swine. *Circulation*, 104(11), 1313-1319. DOI: [10.1161/hc3601.094295](https://doi.org/10.1161/hc3601.094295)
- **Chen P-S., Garfinkel A., Weiss J.N., y Karagueuzian H.S.** (1998). Computerized mapping of fibrillation in normal ventricular myocardium. *Chaos*, 8(1), 127-136. DOI: [10.1063/1.166293](https://doi.org/10.1063/1.166293).
- **Chen P-S., Charles D., Swerdlow C., Hwang C., y Karagueuzian H.S.** (2007). Current Concepts of Ventricular Defibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 9(5), 553-562. DOI: [10.1111/j.1540-8167.1998.tb01848.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1998.tb01848.x).
- **Chorro F.J., Cánoves J., Guerrero J., Mainar L., Sanchis J., Such L., y López-Merino V.** (2000a). Alteration of ventricular fibrillation by flecainide, verapamil, and sotalol: an experimental study. *Circulation*, 101(13), 1606-1615. DOI: [10.1161/01.CIR.101.13.1606](https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.13.1606)
- **Chorro F.J., Cánoves J., Guerrero J., Mainar L., Sanchís J., Llavador E., Such L.M., López Merino V., y Such L.** (2000b). Cartografía epicárdica de la activación reentrante durante la fibrilación ventricular.

- Estudio experimental. *Revista Española de Cardiología*, 53(10), 1356–1364.
- **Chorro F.J., Millet J., Ferrero A., Cebrián A., Cánoves J., Martínez A., Mainar L., Porres J.C., Sanchis J., López Merino V., y Such L.** (2002a). Efecto del estiramiento miocárdico sobre las frecuencias de activación determinadas mediante análisis espectral durante la fibrilación ventricular. *Revista Española de Cardiología*, 55(11), 1143–1150.
  - **Chorro F.J., Guerrero J., Ferrero A., Tormos A., Mainar L., Millet J., Cánoves J., Porres J.C., Sanchis J., Lopez-Merino V., y Such L.** (2002b). Effects of acute reduction of temperature on ventricular fibrillation activation patterns. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 283(6), 2331–2340.
  - **Chorro F.J., Ferrero A., Cánoves J., Mainar L., Porres J.C., Navarro A., Sanchis J., Millet J., Bodí V., López-Merino V., y Such L.** (2003). Significance of the morphological patterns of electrograms recorded during ventricular fibrillation: an experimental study. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 26(5), 1262–1269. DOI: [10.1046/j.1460-9592.2003.t011-1-00178.x](https://doi.org/10.1046/j.1460-9592.2003.t011-1-00178.x)
  - **Chorro F.J., Trapero I., Guerrero J., Such L.M., Cánoves J., Mainar L., Ferrero A., Blasco E., Sanchis J., Millet J., Tormos A., Bodí V., y Alberola A.** (2005). Modification of ventricular fibrillation activation patterns induced by local stretching. *Journal Cardiovascular Electrophysiology*, 16(10), 1087–1096. DOI: [10.1111 / j.1540-8167.2005.40810.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2005.40810.x).
  - **Chorro F.J., Guerrero J., Cánoves J., Trapero I., Mainar L., Pelechano F., Blasco E., Such-Miquel L., Ferrero A., Sanchis J., Bodí V., Cerdá J.M., Alberola A., y Such L.** (2008). Changes in the spectral characteristics of ventricular fibrillation in lesions produced by radiofrequency ablation. An

experimental study. *Revista Española de Cardiología*, 61(4), 394–403. DOI: [10.1016/S1885-5857\(08\)60140-1](https://doi.org/10.1016/S1885-5857(08)60140-1).

- **Chorro F.J., Such-Belenguer L., y López-Merino V.** (2009). Medicina cardiovascular traslacional (I). Modelos animales de enfermedad cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*, 62(1), 69-84. DOI: [10.1016/S0300-8932\(09\)70023-5](https://doi.org/10.1016/S0300-8932(09)70023-5).
- **Chorro F.J., Pelechano F., Trapero I., Ibañez-Catalá X., Such-Miquel L., Tormos A., Guerrero J., Cánoves J., Mainar L., Millet J., Alberola A., y Such L.** (2011). Modifications in ventricular fibrillation and capture capacity induced by a linear radiofrequency lesion. *Revista Española de Cardiología*, 65(2), 143–151. DOI: [10.1016/j.rec.2011.09.016](https://doi.org/10.1016/j.rec.2011.09.016).
- **Chuong P., Wysoczynski M., y Hellmann J.** (2019). Do Changes in Innate Immunity Underlie the Cardiovascular Benefits of Exercise?. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 70. DOI: [10.3389/fcvm.2019.00070](https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00070).
- **Coker S.J.** (1989). Anesthetized rabbit as a model for ischemia and reperfusion induced arrhythmias: effects of quinidine and bretilium. *J Pharmacol Methods*; 21(4), 263-79. DOI: [10.1016/0160-5402\(89\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0160-5402(89)90064-8)
- **Cole W.C., McPherson C.D., y Sontag D.** (1991). ATP-Regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circulation Research*, 69, 571-581. DOI: [10.1161/01.RES.69.3.571](https://doi.org/10.1161/01.RES.69.3.571).
- **Collins H.L., Loka A.M., y DiCarlo S.E.** (2005). Daily exercise-induced cardioprotection is associated with changes in calcium regulatory proteins in hypertensive rats. *American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology* 288, H532–H540. DOI: [10.1152/ajpheart.00873.2004](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00873.2004).
- **Cook D.L., y Hales C.N.** (1984). Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature*, 311, 271-273. DOI: [10.1038/311271a0](https://doi.org/10.1038/311271a0).

- **Coronel R., Opthof T., Taggart P., Tytgat J. y Veldkamp M.** (1997). Differential electrophysiology of repolarisation from clone to clinic. *Cardiovascular Research*, 33(3), 503–517. DOI: [10.1016/S0008-6363\(96\)00271-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(96)00271-4).
- **Csonka C., Onody A., Csont T., y Ferdinandy P.** (2003). Defibrillatory action of glibenclamide is independent from ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and free radicals. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 41(6), 916–922. DOI:[10.1097/00005344-200306000-00013](https://doi.org/10.1097/00005344-200306000-00013).
- **Da Silva V.L., Lima-Leopoldo A.P., Ferron A.J.T., Cordeiro J.P., Freire P.P., de Campos D.H.S., Padovani C.R., Sugizaki M.M., Cicogna A.C., y Leopoldo A.** (2017). Moderate exercise training does not prevent the reduction in myocardial L-type Ca<sub>2+</sub> channels protein expression at obese rats. *Physiological Reports*, 5(19), e13466. DOI: [10.14814/phy2.13466](https://doi.org/10.14814/phy2.13466).
- **De los Nietos C.** (2007). Nociones básicas de anatomía, fisiología y patología cardiaca: bradiarritmias y taquiarritmias. *Enfermería en Cardiología*, 14(40), 7-20. Recuperado de: <https://www.enfermeriaencardiologia.com/wp-content/uploads/4001.pdf>
- **Del-Canto I., Brines L., Such-Miquel L., Parra G., Gallego N., Soler C., Alberola A., Chorro F.J., Guerrero J., y Such L.** (2012a). Effect of physical training and IK<sub>ATP</sub> blockade on the energy to reverse ventricular fibrillation in the regional myocardial ischemia. An experimental study. *European Heart Journal*, 33(1055).
- **Del-Canto I., Gallego N., Soler C., Brines L., Koninckx M., Such-Miquel L., Parra G., Guerrero J., Barber J., Chorro F.J., Alberola A., y Such L.** (2012b). Study of the effect of IK<sub>ATP</sub> blockade with glibenclamide on physiological heterogeneity of the ventricular myocardium. An experimental research. *Acta Physiologica*, 206(693), 206.
- **Del Canto I., Santamaría L., Genovés P., Such-Miquel L., Arias-Mutis O., Zarzoso M., Soler C., Parra G., Tormos Á., Alberola A., Such L. y**

- Chorro F.J.** (2018). Effects of the Inhibition of Late Sodium Current by GS967 on Stretch-Induced Changes in Cardiac Electrophysiology. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 32, 413–425. DOI: 10.1007/s10557-018-6822-x.
- **Demirel H.A, Powers S.K, Caillaud C., et al.** (1998). Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Medicine & Science in Sports & Exercise (MSSE)*, 30, 1211–1216. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710859>
  - **Demirel H.A, Powers S.K, Zergeroglu M.A, et al.** (2001). Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia–reperfusion in the rat. *Journal of Applied Physiology*, 91(5), 2205–2012. DOI: [10.1152 / jappl.2001.91.5.2205](https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.5.2205)
  - **Di Diego J.M. y Antzelevitch C.** (1993). Pinacidil-induced electrical heterogeneity and extrasystolic activity in canine ventricular tissues. Does activation of ATP-regulated potassium current promote phase 2 reentry? *Circulation*, 88(3), 1177–1189. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689041>
  - **Di Diego J.M. y Antzelevitch C.** (2011). Ischemic ventricular arrhythmias experimental models and their clinical relevance. *Heart Rhythm*, 8(12), 1963-1968. DOI: [10.1016/j.hrthm.2011.06.036](https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.06.036).
  - **Díaz D., B.** (2012). Efecto del ejercicio físico crónico sobre las características de la fibrilación ventricular, la refractariedad y el proceso de activación miocárdica durante la arritmia, en el corazón normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda (tesis doctoral). Universitat de València, Valencia.
  - **Dillon S.M.** (1992). Synchronized repolarization after defibrillation shocks. A possible component of the defibrillation process demonstrated by optical recordings in rabbit heart. *Circulation*, 85(5), 1865-1878. DOI: [10.1161/01.cir.85.5.1865](https://doi.org/10.1161/01.cir.85.5.1865)

- **Dillon S.M., y Kwaku K.F.** (1998). Progressive depolarization: a unified hypothesis for defibrillation and fibrillation induction by shocks. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 9(5), 529-552. DOI: [10.1111/j.1540-8167.1998.tb01847.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1998.tb01847.x)
- **Dor-Haim H., Berenfeld O., Horowitz M., Lotan C. y Swissa M.** (2013). Reduced ventricular arrhythmogeneity and increased electrical complexity in normal exercised rats. *PLoS ONE*, 8(6), e66658. DOI: [10.1371/journal.pone.0066658](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066658)
- **Doustar Y., Soufi F.G., Jafary A., Saber M.M. y Ghiassie R.** (2012). Role of four-week resistance exercise in preserving the heart against ischaemia–reperfusion-induced injury. *Cardiovascular Journal of Africa*, 23(8), 451-455. DOI: [10.5830 / CVJA-2012-050](https://doi.org/10.5830/CVJA-2012-050)
- **Downey J.M., Miura T., Eddy L.J., Chambers D.E., Mellert T., Hearse D.J., Yellon D.M.** (1987). Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol*, 19, 1053-1560. DOI: [10.1016/s0022-2828\(87\)80350-4](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(87)80350-4).
- **Du Q., Jovanovic S., Clelland A., Sukhodub A., Budas G., Phelan K., et al.** (2006). Overexpression of SUR2A generates a cardiac phenotype resistant to ischemia. *The FASEB Journal*, 20(8), 1131–1141. DOI: [10.1096 / fj.05-5483com](https://doi.org/10.1096/fj.05-5483com)
- **Dun W., Baba S., Yagi T. y Boyden P.A.** (2004). Dynamic remodeling of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in cells that survived in the epicardial border zone of canine healed infarcted heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 287(3), 1046–1054. DOI: [10.1152/ajpheart.00082.2004](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00082.2004)
- **Duytschaever M., Mast F., Killian M., Blaauw Y., Wijffels M., y Allessie M.** (2001). Methods for determining the refractory period and excitable gap during persistent atrial fibrillation in the goat. *Circulation*, 104(8), 957–962.

- **Efimov I. y Nikolski V.** (2006). “Mecanismos de la excitabilidad y la propagación del impulso en la unión AV”. En Zipes y Jalife (Eds). *Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside* (4th edition). New York: Elsevier. Edición traducida: “*Arritmias*”. (2006). (pp. 203-212). Madrid: Marban Libros.
- **Efimov I.R., Cheng Y., Van Wagoner D.R., Mazgalev T., y Tchou P.J.** (1998). Virtual electrode-induced phase singularity: a basic mechanism of defibrillation failure. *Circulation Research*, 82(8), 918-925. DOI: [10.1161/01.res.82.8.918](https://doi.org/10.1161/01.res.82.8.918)
- **Ekelund L.G., Haskell W.L., Johnson J.L., Whaley F.S., Criqui M.H., et al.** (1988). Physical fitness as a predictor of cardiovascular mortality in asymptomatic North American men. The lipid research clinics mortality follow-up study. *The New England Journal of Medicine*, 319(21), 1379–1384. DOI: [10.1056 / NEJM198811243192104](https://doi.org/10.1056/NEJM198811243192104)
- **Elharrar V., Foster P.R., Jirak T.L., Gaum W.E., y Zipes D.P.** (1977). Alterations in canine myocardial excitability during ischemia. *Circulation Research*, 40(1), 98–105. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=830442>
- **Elharrar V., Gaum W.E. y Zipes D.P.** (1977). Effects of drugs on conduction delay and the incidence of ventricular arrhythmias induced by acute coronary occlusion in dogs. *American Journal of Cardiology*, 39, 544-549. DOI: [10.1016/S0002-9149\(77\)80164-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(77)80164-1)
- **El-Reyani N.E, Bozdogan Ö., Baczkó I., Leprán I. y Gy Papp J.** (1999). Comparison of the efficacy of glibenclamide and glimepiride in reperfusion-induced arrhythmias in rats. *European Journal of Pharmacology*, 365(2–3), 187-192. DOI: [10.1016/S0014-2999\(98\)00866-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00866-8)
- **Elrod J.W., Harrell M., Flagg T.P., Gundewar S., Magnuson M.A., Nichols C.G., et al.** (2008). Role of sulfonylurea receptor type 1 subunits of ATP-sensitive potassium channels in myocardial ischemia/reperfusion

injury. *Circulation*, 117(11), 1405–1413. DOI: 10.1161 / CIRCULATIONAHA.107.745539

- **Englert, H.C., Heitsch, H., Gerlach, U., y Knieps, S.** (2003). Blockers of the ATP sensitive potassium channel SUR2A/Kir6.2: a new approach to prevent sudden cardiac death. *Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular & Hematological Agents*, 1(3), 253-71. DOI: [10.2174 / 1568016033477423](https://doi.org/10.2174/1568016033477423)
- **Esparza Bertolín, M.** (2018). Estudio de recurrencias tras cardioversión eléctrica de fibrilación auricular mediante aplicación de análisis no lineal del electrocardiograma. *Trabajo final de grado IBM. UPV*. Recuperado de. <http://hdl.handle.net/10251/106514>
- **Evans J., Hamilton T., Longman S., Stemp G., Sanguinetti M., y Salata J.** (1996). Cardiac potassium channel modulators: potential for antiarrhythmic therapy. En Evans J., Hamilton T., Longman S., y Stemp G. (Eds). *Potassium channels and their modulators. From synthesis to clinical experience*, (pp. 221-256). London: Taylor & Francis.
- **Farid T., Nair K., Masse S., Azam M.A., Maguy A., Lai P.F.H., Umopathy K., Dorian P.,... Nanthakumar K.** (2011). Role of  $K_{ATP}$  channels in the maintenance of ventricular fibrillation in cardiomyopathic human hearts. *Circulation Research*, 109(11), 1309-1318. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.110.232918](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.232918)
- **Fernandes T., Baraúna V.G., Negrão C.E., Phillips M.I., y Oliveira E.M.** (2015). Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 309(4), H543–H552. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00899.2014>.
- **Findlay I.** (1992). Inhibition of ATP-sensitive  $K^+$  channels in cardiac muscle by the sulphonylurea drug glibenclamide. *The Journal of Pharmacology and*

*Experimental Therapeutics*, 261(2), 540-545. Recuperado de: <http://jpet.aspetjournals.org/content/261/2/540.long>

- **Fiuza-Luces, C., Santos-Lozano, A., Joyner, M., Carrera-Bastos, P., Picazo, O., Zugaza, J. L., Izquierdo, M., Ruilope, L. M., y Lucia, A.** (2018). Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors. *Nature Reviews. Cardiology*, 15(12), 731–743. DOI:[10.1038/s41569-018-0065-1](https://doi.org/10.1038/s41569-018-0065-1).
- **Flagg T.P., Enkvetchakul D., Koster J.C., y Nichols C.G.** (2010). Muscle  $K_{ATP}$  Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. *Physiological Reviews*, 90(3), 799–829. DOI: [10.1152 / physrev.00027.2009](https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2009)
- **Fosset M., De Weille J.R., Green R.D., Schmid-Antomarchi H., y Lazdunski M.** (1988). Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent  $K^+$  channels. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 7933-7936. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=2453509>
- **Foster M.N. y Coetzee W.A.** (2016).  $K_{ATP}$  Channels in the Cardiovascular System. *Physiological reviews*, 96(1), 177–252. DOI:[10.1152/physrev.00003.2015](https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2015)
- **French J.P., Quindry J.C., Falk D.J., et al.** (2006). Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *American Journal of Physiology - Heart Circulation Physiology*, 290(1), H128–36. DOI: [10.1152/ajpheart.00739.2005](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00739.2005)
- **Fuentes F., Mendoza R.A., Rivera R. y Vara M.** (2010). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejos. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2010. 48 p. Recuperado de: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manejo.cuidado.conejos.pdf>

- **Fuller, E.O., y Nutter, D.O.** (1981). Endurance training in the rat. II. Performance of isolated and intact heart. *Journal of Applied Physiology*, 51, 941-947. DOI: [10.1152/jappl.1981.51.4.941](https://doi.org/10.1152/jappl.1981.51.4.941)
- **Furukawa T., Kimura S., Furukawa N., Bassett A.L., y Myerburg R.J.** (1991). Role of cardiac ATP-regulated potassium channels in differential responses of endocardial and epicardial cells to ischemia. *Circulation Research*, 68, 1693-1702. DOI: [10.1161/01.RES.68.6.1693](https://doi.org/10.1161/01.RES.68.6.1693)
- **Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V., et al.** (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation Research*, 81(6), 1072–1082. DOI: [10.1161 / 01.res.81.6.1072](https://doi.org/10.1161/01.res.81.6.1072)
- **Gaztañaga L., Marchlinski F.E., y Betensky B.P.** (2012). Mecanismos de las arritmias cardiacas. *Revista Española de Cardiología*, 65 (2), 174-185. DOI: [10.1016/j.recesp.2011.09.018](https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.09.018)
- **Genovesi S., Zaccaria D., Rossi E., Valsecchi M.A., Stella A. y Strambadiale M.** (2007). Effects of exercise training on heart rate and QT interval in healthy young individuals: are there gender differences? *Europace*, 9(1), 55–60. DOI: [10.1093 / europace / eul145](https://doi.org/10.1093/europace/eul145)
- **Gilmour R.F. Jr., y Zipes D.P.** (1980). Different electrophysiological responses of canine endocardium and epicardium to combined hyperkalemia, hypoxia, and acidosis. *Circulation Research*, 46, 814-825. DOI: [10.1161/01.res.46.6.814](https://doi.org/10.1161/01.res.46.6.814)
- **Gögelein H.** (2001). Inhibition of cardiac ATP-dependent potassium channels by sulfonylurea drugs. *Current Opinion Investigational Drugs Journal*, 2(1), 72–80. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=11527016>
- **Golbidi S., y Laher I.** (2012). Exercise and the Cardiovascular System. *Hindawi Publishing Corporation Cardiology Research and Practice*, 2012, ID 210852, 0-15. DOI: [10.1155/2012/210852](https://doi.org/10.1155/2012/210852)

- **Gonca E., y Bozdogan Ö.** (2010). Mitochondrial  $K_{ATP}$  channel opening and sarcolemmal  $K_{ATP}$  channel blockage confer protection against ischemia/reperfusion-induced arrhythmia in anesthetized male rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 15(4), 403-411. DOI: [10.1177 / 1074248410372925](https://doi.org/10.1177/1074248410372925)
- **Grande, F., y Taylor, H.L.** (1965). Adaptive changes in the heart, vcsscls, and ~iatterns of control under chronically gh loads. *In Handbook of Physiology, Sect. 2, Circulation*. Vol. III, ed. W. F. Hamilton, P. Dew, pp. 2615-78. Washington DC: Am. Physiol. Soc. 2765 pp
- **Grant A., y Durrani S.** (2007). Mechanisms of cardiac arrhythmias. En: Topol (Eds), *Textbook of Cardiovascular Medicin* (3<sup>a</sup> ed), (pp. 950-963). Filadelfia: Lippicontt.
- **Gross E.R., y Gross G.J.** (2007). Pharmacologic therapeutics for cardiac reperfusion injury. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 12(3), 367-88. DOI: [10.1517/14728214.12.3.367](https://doi.org/10.1517/14728214.12.3.367)
- **Gross, G.J., y Fryer R.M.** (1999). Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channels and myocardial preconditioning. *Circulation Research*, 84(9), 973-979. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10325234>
- **Gross G.J., y Peart J.N.** (2003).  $K_{ATP}$  channels and myocardial preconditioning: an update. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 285(3), 921–930. DOI: [10.1152/ajpheart.00421.2003](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00421.2003)
- **Grover G.J., y Garlid K.D.** (2000). ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(4), 677– 95. DOI: [10.1006 / jmcc.2000.1111](https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1111)
- **Gumina R.J., Pucar D., Bast P., Hodgson D.M., Kurtz C.E., Dzeja P.P., Miki T., Seino S., y Terzic A.** (2003). Knockout of Kir6.2 negates

ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 284, H2106–H2113. DOI: [/10.1152/ajpheart.00057.2003](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00057.2003)

- **Gunnar Blomqvist.** Cardiovascular adaptations to physical training. (1983). *Ann. Rev. Physiol.*, 4J,169-89.
- **Guo Y., Chen J., y Qiu H.** (2020). Novel Mechanisms of Exercise-Induced Cardioprotective Factors in Myocardial Infarction. *Frontiers in Physiology*, 11, 199. DOI:[10.3389/fphys.2020.00199](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00199)
- **Gwathmey J.K., Slawsky M.T., Perreault C.L., Briggs G.M., Morgan J.P., y Wei J.Y.** (1990). Effect of exercise conditioning on excitation-contraction coupling in aged rats. *Journal of Applied Physiology*, 69(4), 1366–1371. DOI: [10.1152/jappl.1990.69.4.1366](https://doi.org/10.1152/jappl.1990.69.4.1366)
- **Hajnal A., Nagy O., Litvai A., Papp J., et al.** (2005). Nitric oxide involvement in the delayed antiarrhythmic effect of treadmill exercise in dogs. *Life Sciences*, 77(16), 1960–1971. DOI: [10.1016/j.lfs.2005.02.015](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.02.015)
- **Halestrap A.P.** (2006). Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 232–237. DOI: [10.1042/BST20060232](https://doi.org/10.1042/BST20060232)
- **Hamer M., y Stamatakis E.** (2008). Physical activity and cardiovascular disease: directions for future research. *The Open Sports Sciences Journal*, 1, 1–2. DOI: [10.2174/1875399X00801010001](https://doi.org/10.2174/1875399X00801010001)
- **Hamilton K.L., Powers S.K., Sugiura T., et al.** (2001). Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 281, H1346–52. DOI: [10.1152/ajpheart.2001.281.3.H1346](https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.3.H1346)
- **Hamilton K.L., Staib J.L., Phillips T., et al.** (2003). Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free*

*Radical Biology and Medicine*, 34, 800–809. DOI: [10.1016/S0891-5849\(02\)01431-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01431-4)

- **Hamilton K.L., Quindry J.C., French J.P., Staib J., Hughes J., Mehta J.L., y Powers S.K.** (2004). MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), 1360-1368. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.025](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.025)
- **Han J. y Moe G.K.** (1964). Nonuniform recovery of excitability in ventricular muscle. *Circulation Research*, 14, 44–60. DOI: [10.1161/01.RES.14.1.44](https://doi.org/10.1161/01.RES.14.1.44)
- **Harper J.R. Jr., Johnson T.A., Engle C.L., Martin D.G., Fleet W., y Gettes L.S.** (1993). Effect of rate on changes in conduction velocity and extracellular potassium concentration during acute ischemia in the in situ pig heart. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 4(6), 661-671. DOI: [10.1111/j.1540-8167.1993.tb01252.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1993.tb01252.x)
- **Harris M.B., y Starnes J.W.** (2001). Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology*, 280(5), H2271–H2280. DOI: [10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2271](https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2271)
- **Haus J.M., y Hill B.G.** (2019). Editorial: Mechanisms by Which Acute and Chronic Exercise Promote Cardiometabolic Health. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6,159. DOI: [10.3389/fcvm.2019.00159](https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00159)
- **Hertzeanu H.L., Shemesh J., Aron L.A., Aron A.L., Peleg E., Rosenthal T., Motro M., y Kellermann J.J.** (1993). Ventricular arrhythmias in rehabilitated and nonrehabilitated postmyocardial infarction patients with left ventricular dysfunction. *American Journal of Cardiology*, 71(1), 24–27. DOI: [10.1016/0002-9149\(93\)90704-G](https://doi.org/10.1016/0002-9149(93)90704-G)
- **Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., y Kurachi Y.** (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Review*, 90(1), 291–366. ie.

*Biochemical Society Transactions*, 34(2), 232–237. DOI: [10.1152/physrev.00021.2009](https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009)

- **Hiraoka M., y Fan Z.** (1989). Activation of ATP-sensitive outward K<sup>+</sup> current by nicorandil (2-nicotinamidoethyl nitrate) in isolated ventricular myocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 250, 278-285. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2526215>
- **Hoffman B.F.** (1964). Physiology of the conduction mechanism. *Annals of New York Academic Sciences.*, 111, 967-971. DOI: [10.1111/j.1749-6632.1964.tb53166.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb53166.x)
- **Horacek T., Neumann M., von Mutius S., Budden M., y Meesmann W.** (1984). Nonhomogeneous electrophysiological changes and the bimodal distribution of early ventricular arrhythmias during acute coronary artery occlusion. *Basic Research in Cardiology*, 79(6), 649–667. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6532435>
- **Hu X., Xu X., Huang Y., Fassett J., Flagg T.P., Zhang Y., et al.** (2008). Disruption of Sarcolemmal ATP-Sensitive Potassium Channel Activity Impairs the Cardiac Response to Systolic Overload. *Circulation Research*, 103(9), 1009–1017. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.107.170795](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.170795)
- **Inagaki N., Gono T., John P. Clement IV J.P., Namba N., Johji Inazawa, Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Seino S., y Bryan J.** (1995). Reconstitution of IK<sub>ATP</sub>: An Inward Rectifier Subunit Plus the Sulfonylurea Receptor. *Science*, 270(5239), 1166-1170. DOI: [10.1126/science.270.5239.1166](https://doi.org/10.1126/science.270.5239.1166)
- **Jalife J.** (1999). Spatial and Temporal Organization in Ventricular Fibrillation. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9(5) 119-127. DOI: [10.1016/S1050-1738\(99\)00019-5](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(99)00019-5)

- **Jalife J.** (2000). Ventricular Fibrillation: Mechanisms of Initiation and Maintenance. *Annual Review of Physiology*, 62, 25-50. DOI: [10.1146/annurev.physiol.62.1.25](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.25)
- **Jalife J.** (2006). Time, space and frequency in ventricular fibrillation. *Revista Española de Cardiología*, 59(9), 859-61. DOI: [10.1157/13092791](https://doi.org/10.1157/13092791)
- **Jalife J., Delmar M., Anumonwo J., Berenfeld O., y Kalifa J.** (2009). *Basic Cardiac Electrophysiology for the Clinician*. (2nd. Edition). Londres, Reino Unido: Wiley-Blackwell.
- **Janse M.J. y Wit A.L.** (1989). Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiology Review*, 69(4), 1049–1169. DOI: [10.1152/physrev.1989.69.4.1049](https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.4.1049).
- **Jeong S.W., Kim S.H., Kang S.H., Kim H.J., Yoon C.H., Youn T.J., y Chae I.H.** (2019). Mortality reduction with physical activity in patients with and without cardiovascular disease. *European Heart Journal*, 40(43), 3547-3555. DOI: [10.1093/eurheartj/ehz564](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz564).
- **Jew K.N., Olsson M.C., Mokolke E.A., Palmer B.M., y Moore R.L.** (2001). Endurance training alters outward K<sup>+</sup> current characteristics in rat cardiocytes. *Journal of Applied Physiology*, 90(4), 1327–1333. DOI: [10.1152/jappl.2001.90.4.1327](https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.4.1327)
- **Jew K.N., y Moore R.L.** (2001). Glibenclamide improves postischemic recovery of myocardial contractile function in trained and sedentary rats. *Journal of Applied Physiology* (1985), 91(4), 1545-1554. DOI: [10.1152/jappl.2001.91.4.1545](https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.4.1545)
- **Jew K.N., y Moore R.L.** (2002). Exercise training alters an anoxia-induced, glibenclamide-sensitive current in rat ventricular cardiocytes. *Journal of Applied Physiology* (1985), 92(4), 1473-1479. DOI: [10.1152/japplphysiol.00513.2001](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00513.2001)

- **Jiang M., Cabo C., Yao J., Boyden P.A., y Tseng G.** (2000). Delayed rectifier K currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovascular Research*, 48(1), 34–43. DOI: [10.1016/s0008-6363\(00\)00159-0](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00159-0)
- **Takei M., Noma A., y Shibasaki T.** (1985). Properties of adenosinetriphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *The Journal of Physiology (London)*, 363, 441-462. DOI: [10.1113/jphysiol.1985.sp015721](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015721)
- **Kersten J.R., Gross G.J., Pagel P.S., y Warltier D.C.** (1998). Activation of adenosine triphosphate-regulated potassium channels. Mediation of cellular and organ protection. *Anesthesiology*, 88(2), 495-513. DOI: [10.1097/0000542-199802000-00029](https://doi.org/10.1097/0000542-199802000-00029)
- **Kimura S., Bassett A.L., Furukawa T., Cuevas J., y Myerburg R.J.** (1990). Electrophysiological properties and responses to simulated ischemia in cat ventricular myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circulation Research*, 66, 469-477. DOI: [doi.org/10.1161/01.RES.66.2.469](https://doi.org/10.1161/01.RES.66.2.469)
- **Kimura S., Bassett A.L., Furukawa T., Furukawa N., y Myerburg R.J.** (1991). Differences in the effect of metabolic inhibition on action potentials and calcium currents in endocardial and epicardial cells. *Circulation*, 84(2), 768–777. DOI: [10.1161/01.CIR.84.2.768](https://doi.org/10.1161/01.CIR.84.2.768)
- **Kimura S., Bassett A.L., Kohya T., et al.** (1986). Simultaneous recording of action potentials from endocardium and epicardium during ischemia in the isolated cat ventricle: Relation of temporal electrophysiologic heterogeneities to arrhythmias. *Circulation*, 74, 401–409. DOI: [10.1161/01.CIR.74.2.401](https://doi.org/10.1161/01.CIR.74.2.401)
- **Kléber A.G., y Rudy Y.** (2004). Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiological Reviews*, 84(2):431-88. DOI: [10.1152/physrev.00025.2003](https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2003)

- **Kloner R.A., y Jennings R.B.** (2001). Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation*, *104*(25), 3158-67.
- **Knisley S.B., Smith W.M., y Ideker R.E.** (1992). Effect of field stimulation on cellular repolarization in rabbit myocardium. Implications for reentry induction. *Circulation Research*, *70*(4):707-15. DOI: [10.1161/01.res.70.4.707](https://doi.org/10.1161/01.res.70.4.707)
- **Kokkinos P., Myers J., Kokkinos J.P., Pittaras A., Narayan P., Manolis A., Karasik P., Greenberg M., Papademetriou V., y Singh S.** (2008). Exercise capacity and mortality in black and white men. *Circulation*, *117*(5), 614–622. DOI: [10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734764](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734764)
- **Kong X., Tweddell J.S., Garrett J., Gross G.J., y Baker J.E.** (2001). Sarcolemmal and Mitochondrial  $K_{ATP}$  Channels Mediate Cardioprotection in Chronically Hypoxic Hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *33*(5), 1041-1045. DOI: [10.1006/jmcc.2001.1362](https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1362)
- **Koninckx Cañada M.** (2015). Estudio de la posible participación de la corriente  $IK_{ATP}$  en las modificaciones que sobre estabilidad y heterogeneidad miocárdica produce el ejercicio físico crónico, en corazón aislado, normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda (tesis doctoral). Universitat de València, Valencia.
- **Kupersmith J., Antman E.M., y Hoffman B.F.** (1975). In vivo electrophysiological effects of lidocaine in canine acute myocardial infarction. *Circulation Research*, *36*(1), 84–91. DOI: [10.1161/01.RES.36.1.84](https://doi.org/10.1161/01.RES.36.1.84)
- **La Rovere M.T., Bersano C., Gnemmi M., Specchia G., y Schwartz P.J.** (2002). Exercise-induced increase in baroreflex sensitivity predicts improved prognosis after myocardial infarction. *Circulation*, *106*(8), 945–949. DOI: [10.1161/01.CIR.0000027565.12764.E1](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000027565.12764.E1)

- **Ladilov Y.V., Siegmund B., y Piper H.M.** (1995). Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *American Journal of Physiology*, 268(4), pp. H1531–H1539. DOI: [10.1152/ajpheart.1995.268.4.H1531](https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.268.4.H1531)
- **Lammers W.J., Allesie M.A. y Bonke F.I.** (1988). Reentrant and focal arrhythmias in low potassium in isolated rabbit atrium. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 255(6 Pt 2), H1359-69. DOI: [10.1152/ajpheart.1988.255.6.H1359](https://doi.org/10.1152/ajpheart.1988.255.6.H1359)
- **Langendorff O.** (1895). Untersuchungen am uberlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch* 61: 291–332. DOI: [10.1007/BF01812150](https://doi.org/10.1007/BF01812150)
- **Lara J., Acevedo J.J., y Onetti C.G.** (1999). Large-conductance Ca<sup>2+</sup> - activated potassium channels in secretory neurons. *Journal of Neurophysiology*, 82(3), 1317-1325. DOI: [10.1152/jn.1999.82.3.1317](https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.3.1317)
- **Lascano E.C., Negroni J.A., Del Valle H.F., y Crottogini A.J.** (2002). Participación de los canales de potasio dependientes de ATP en el mecanismo de preconditionamiento. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología*, 31(1), 91-99. Recuperado de: <http://www.fac.org.ar/revista/02v31n1/lascano/lascano.htm>
- **Lavie C.L., Ozemek C., Carbone S., Katzmarzyk P.T., y Blair S.N.** (2019) Sedentary Behavior, Exercise, and Cardiovascular Health. *Circulation Research*, 124(5), 799-815. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.118.312669](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312669).
- **Lawler J.M., Kwak H.B., Kim J.H., y Suk M.H.** (2009). Exercise training inducibility of MnSOD protein expression and activity is retained while reducing prooxidant signaling in the heart of senescent rats. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296, R1496–R1502. DOI: [10.1152/ajpregu.90314.2008](https://doi.org/10.1152/ajpregu.90314.2008)
- **Lederer W.J., Nichols C.G., y Smith G.L.** (1989). The mechanism of early contractile failure of isolated rat ventricular myocytes subjected to complete

metabolic inhibition. *The Journal of Physiology (London)*, 413(1), 329–349. DOI: [10.1113/jphysiol.1989.sp017657](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017657)

- **Lennon S.L., Quindry J., Hamilton K.L., French J., Staib J., Mehta J.L., y Powers S.K.** (2004). Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *Journal of Applied Physiology (1985)*, 96(4), 1299-1305. DOI: [10.1152/jappphysiol.00920.2003](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00920.2003)
- **Lennon S.L., Quindry J.C., French J.P., et al.** (2004). Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion. *Acta Physiologica Scandinavica*, 182(2), 161–69. DOI: [10.1111/j.1365-201X.2004.01346.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01346.x)
- **Lennon S.L., Quindry J.C., Hamilton K.L., et al.** (2004). Elevated MnSOD is not required for exercise-induced cardioprotection against myocardial stunning. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(2), H975–H980. DOI: [10.1152/ajpheart.01208.2003](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01208.2003)
- **Leon A.S., Bloor C.M.** (1968). Effects of exercise and its cessation on the heart and its blood supply. *J. Appl. Physiol.*, 24,485-90.
- **Leprán I., Baczkó I., Varró A., y Papp J.Gy.** ATP-sensitive potassium channel modulators: Both pinacidil and glibenclamide produce antiarrhythmic activity during acute myocardial infarction in conscious rats. (1996). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(3),1215-1220. Recuperado de. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0030432493&origin=inward>
- **Liao R., Podesser B.K., y Lim C.C.** (2012). The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 303(2), H156–H167. DOI: [10.1152/ajpheart.00333.2012](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00333.2012)

- **Liu X., Platt C., y Rosenzweig A.** (2017). The Role of MicroRNAs in the Cardiac Response to Exercise. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(12), a029850. DOI: 10.1101/cshperspect.a029850
- **Liu Y., Ren G., O'Rourke B., Eduardo Marbán E., y Seharaseyon J.** (2001). Pharmacological comparison of native mitochondrial  $K_{ATP}$  channels with molecularly defined surface  $K_{ATP}$  channels. *Molecular Pharmacology*, 59(2), 225-230. DOI: [10.1124/mol.59.2.225](https://doi.org/10.1124/mol.59.2.225)
- **López L.** (2008). Efectos del ejercicio físico crónico sobre la excitabilidad intrínseca miocárdica. Estudio experimental. Tesis doctoral UV. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10803/9913>
- **Lue W.M y Boyden P.A.** (1992). Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. Alterations in  $V_{max}$  and the transient outward current. *Circulation*, 85, 1175–1188. DOI: [10.1161/01.CIR.85.3.1175](https://doi.org/10.1161/01.CIR.85.3.1175)
- **Mace L.C., Palmer B.M., Brown D.A., Jew K.N., Lynch J.M., Glunt J.M., Parsons T.A., Cheung J.Y., y Moore R.L.** (2003). Influence of age and run training on cardiac  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange. *Journal Applied of Physiology*, 95(5), 1994–2003,
- **Maharaj T, Rodriguez B, Blake R, Trayanova NA, Gavaghan DJ.** (2006). Transmural electrophysiological heterogeneities in action potential duration increase the upper limit of vulnerability. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc., 1*, 4043-4046. DOI: [10.1109/IEMBS.2006.259345](https://doi.org/10.1109/IEMBS.2006.259345)
- **Manson J.E., Greenland P., LaCroix A.Z., Stefanick M.L., Mouton C.P., et al.** (2002). Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *The New England Journal of Medicine*, 347, 716–725. DOI: [10.1056/NEJMoa021067](https://doi.org/10.1056/NEJMoa021067)
- **Marcil M, Bourduas K., Ascah A., y Burelle Y.** (2006). Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in  $Ca^{2+}$ -induced permeability

transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 290(4), H1549-57. Epub 2005. DOI: [10.1152/ajpheart.00913.2005](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00913.2005)

- **Maxwell M.P., Hearse D.J., y Yellon D.M.** (1987). Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 21, 737-746. DOI: [10.1093/cvr/21.10.737](https://doi.org/10.1093/cvr/21.10.737)
- **McPherson C.D., Pierce G.N., y Cole W.C.** (1993). Ischemic cardioprotection by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels involves high-energy phosphate preservation. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 265(5 Pt 2), H1809–H1818. DOI: [10.1152/ajpheart.1993.265.5.H1809](https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.265.5.H1809)
- **Mestre M., Escande D., y Cavero I.** (1988). Glybenclamide blocks the transmembrane action potential shortening evoked by cromakalim in guinea-pig papillary muscle (abstract). *British Journal of Pharmacology (suplemento)*, 95, 571P. DOI: [10.1111/j.1476-5381.1988.tb16614.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb16614.x)
- **Moe G.K., y Abildskov J.A.** (1959). Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *American Heart Journal*, 58(1), 59-70. DOI: [10.1016/0002-8703\(59\)90274-1](https://doi.org/10.1016/0002-8703(59)90274-1)
- **Mokelke E.A., Palmer B.M., Cheung J.Y., y Moore R.L.** (1997). Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 273(3), H1193–H1197.
- **Morales C., Rodriguez M., Gonzalez G., Matoso M., Bertolasi C., y Gelpi R.** (2001). Cronodinamia del infarto de miocardio en el conejo. *Medicina (Buenos Aires)*, 61, 830-836. Recuperado de: [http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol61-01/6/v61\\_n6\\_p830\\_836.pdf](http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol61-01/6/v61_n6_p830_836.pdf)

- **Morris J.N., Everitt M.G., Pollard R., Chave S.P., y Semmence A.M** (1980). Vigorous exercise in leisure-time: protection against coronary heart disease. *The Lancet*, 316(8206), 1207–1210. DOI: [10.1016/S0140-6736\(80\)92476-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)92476-9)
- **Mountcastle V.B** (Ed) 1974). *Medical Physiology* (13 edición). Universidad de Michigan, Estados Unidos: C. V. Mosby Co.
- **Mozaffarian D., Furberg C.D., Psaty B.M., y Siscovick D.** (2008). Physical Activity and Incidence of Atrial Fibrillation in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Circulation*, 118(8), 800-807. DOI: [10.1161/CIRCULATIONAHA.108.785626](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.785626)
- **Muntz K.W., Gonyea W.J., y Mitchell J.H.** (1981). Cardiac hypertrophy in response to an isometric training program in the cat. *Circulation Research*, 49, 1092-110. DOI: [10.1161/01.RES.49.5.1092](https://doi.org/10.1161/01.RES.49.5.1092)
- **Murry C.E., Jennings R.B., y Reimer K.A.** (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124-1136. DOI: [10.1161/01.cir.74.5.1124](https://doi.org/10.1161/01.cir.74.5.1124)
- **Myers J., Prakash M., Froelicher V., Do D., Partington S., et al.** (2002). Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *The New England Journal of Medicine*, 346, 793-801. DOI: [10.1056/NEJMoa011858](https://doi.org/10.1056/NEJMoa011858)
- **Natali, A.J., Wilson, L.A., Peckham, M., Turner, D.L., Harrison, S.M., y White, E.** (2002). 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. DOI: [10.1113/jphysiol.2001.013415](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013415)
- **Nattel S., Maguy A., Le Bouter S., e Yeh Y.H.** (2007). Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and

atrial fibrillation. *Physiological Reviews*, 87(2), 425–456.  
DOI: [10.1152/physrev.00014.2006](https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2006)

- **Neely J.R., Liebermeister H., Battersby E.J. y Morgan H.E.** (1967). Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *American Journal of Physiology*, 212, 804–814. DOI: [10.1152/ajplegacy.1967.212.4.804](https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1967.212.4.804)
- **Ng, J., Kadish, A.H., y Goldberger, J.J.** (2007). Technical considerations for dominant frequency analysis. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 18(7), 757–764. DOI: [10.1111/j.1540-8167.2007.00810.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2007.00810.x)
- **Nichols C.G., y Lederer W.J.** (1990). The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(2), 183–194. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2311000>
- **Noma A.** (1983). ATP-regulated K channels in cardiac muscle. *Nature*, 305, 147-148. Recuperado de: <https://www.nature.com/articles/305147a0#article-info>
- **Noma A., y Shibasaki T.** (1985). Membrane current through adenosinetriphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *The Journal of Physiology (Lond)*, 363, 463-480. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1192941/>
- **Nutter D.O., Priest R.E., y Fuller E.O.** (1981). Endurance training in the rat. I. Myocardial mechanics and biochemistry. *Journal of Applied Physiology.*, 51, 934-4.
- **Opie L.H.** (2004). *Heart Physiology: From Cell to Circulation* (4th Ed.). Philadelphia, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.
- **Orts L.** (2007). Efectos del ejercicio físico crónico sobre la refractariedad miocárdica ventricular, la velocidad de conducción y el patrón fibrilatorio

ventricular intrínsecos, tras la oclusión arterial coronaria aguda: un estudio experimental (tesis doctoral). Universitat de València, Valencia.

- **Osterrieder W.** (1988). Modification of K' conductance of heart cell membrane by BRL 34915. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 337(1), 93-97. DOI: [10.1007/BF00169483](https://doi.org/10.1007/BF00169483)
- **Paffenbarger R.S. Jr., Hyde R.T., Wing A.L., Lee I.M., Jung D.L., y Kampert J.B.** (1993). The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *The New England Journal of Medicine*, 328(8), 538-545. DOI: [10.1056/NEJM199302253280804](https://doi.org/10.1056/NEJM199302253280804)
- **Paffenbarger R.S. Jr., Laughlin M.E., Gima A.S., y Black R.A.** (1970). Work activity of longshoremen as related to death from coronary heart disease and stroke. *The New England Journal of Medicine*, 282, 1109-14. DOI: [10.1056/NEJM197005142822001](https://doi.org/10.1056/NEJM197005142822001)
- **Palmer B.M., Lynch J.M., Snyder S.M., y Moore R.L.** (1999). Effects of chronic run training on Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> efflux from rat left ventricular myocytes. *Journal of Applied Physiology*, 86(2), 584-591. DOI: [10.1152/jappl.1999.86.2.584](https://doi.org/10.1152/jappl.1999.86.2.584)
- **Parra G., Zarzoso M., Such-Miquel L., Brines L., Alberola A., Rams C., Such L., y Chorro F.J.** (2010). El ejercicio físico crónico aumenta la longitud de onda del proceso de activación ventricular en el miocardio isquémico. Estudio experimental. *Revista Española de Cardiología*, 63(3), 194. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-cirugia-ortopedica-traumatologia-129-congresos-sec-2010-el-3-sesion-prevencion-rehabilitacion-465-comunicacion-el-ejercicio-fisico-cronico-aumenta-4884-pdf>.
- **Parra G.** (2012). Estudio de los efectos del entrenamiento físico sobre algunas propiedades electrofisiológicas miocárdicas ventriculares mediante el análisis de la fibrilación ventricular inducida. Una investigación en

corazón aislado de conejo (tesis doctoral). Universitat de València, Valencia.  
 Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/3457/345732288005.pdf>

- **Peart J.N., y Gross G.J.** (2002). Sarcolemmal and mitochondrial  $K_{ATP}$  channels and myocardial ischemic preconditioning. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 6(4), 453-64. DOI: [10.1111/j.1582-4934.2002.tb00449.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00449.x)
- **Pelechano F.** (2008). Efectes electrofisiològics miocàrdics intrínsecs sobre l'automatisme, la conducció i la refractarietat produïts per la realització d'un protocol d'entrenament. Estudi experimental (tesis doctoral). Universitat de València, Valencia.
- **Pérez I., Fantinelli J., González L.F., y Mosca S.** (2011). Mitochondrial  $K_{ATP}$  channels participate in the limitation of infarct size by cariporide. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383, 563–571. DOI: [10.1007/s00210-011-0632-z](https://doi.org/10.1007/s00210-011-0632-z)
- **Perhonen M.A., Haapalahti P., Kivisto S., Hekkala A.M., Vaananen H., Swan H., y Toivonen L.** (2006). Effect of physical training on ventricular repolarization in type 1 long QT syndrome: a pilot study in asymptomatic carriers of G589D KCNQ1 mutation. *Europace* 8: 894–898,
- **Pernia A., Calderón E., y Torres L.M.** (2001). Fisiología Cardiovascular. Torres LM (col.), *Tratado de Anestesia y Reanimación, I*. Madrid: Arán Ediciones. ISBN 848672581X, 9788486725815.
- **Peters N., Cabo C., y Wit A.** (2003). Arrhythmogenic Mechanisms: Automaticity, Triggered Activity and Reentry. En Zipes D.P y Jalife J (Eds.), *Cardiac Electrophysiology, From Cell To Bedside* (3.<sup>a</sup> ed), (pp. 345-355). Filadelfia: Saunders.
- **Pinckard K., Baskin K.K., y Stanford K.I.** (2019). Effects of Exercise to Improve Cardiovascular Health. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 69. DOI: [10.3389/fcvm.2019.00069](https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00069)

- **Pinto J.M. y Boyden PA.** (1999). Electrical remodeling in ischemia and infarction. *Cardiovascular Research*, 42(2), 284–297. DOI: [10.1016/s0008-6363\(99\)00013-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00013-9)
- **Piper H. M., Abdallah Y., y Schäfer C.** (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 61(3), 365–371. DOI: [10.1016/j.cardiores.2003.12.012](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.012)
- **Posel D., Noakes T., Kantor P., Lambert M., y Opie L.H.** (1989) Exercise training after experimental myocardial infarction increases the ventricular fibrillation threshold before and after the onset of reinfarction in the isolated rat heart. *Circulation*, 80(1),138–145. DOI: [10.1161/01.cir.80.1.138](https://doi.org/10.1161/01.cir.80.1.138)
- **Powers S.K., Quindry J.C., y Kavazis A.N.** (2008). Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 193-201. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.006](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.006)
- **Powers S.K., Smuder A.J., Kavazis A.N., y Quindry J.C.** (2014). Mechanisms of Exercise-Induced Cardioprotection. *Physiology*, 29(1), 27-38. DOI: [10.1152/physiol.00030.2013](https://doi.org/10.1152/physiol.00030.2013)
- **Powers S.K., Sollanek K.J., Wiggs M.P., Demirel H.A., y Smuder A. J.** (2014). Exercise-induced improvements in myocardial antioxidant capacity: the antioxidant players and cardioprotection. *Free Radical Research*, 48(1), 43–51. DOI: [10.3109/10715762.2013.825371](https://doi.org/10.3109/10715762.2013.825371)
- **Quindry J., French J., Hamilton K., et al.** (2005). Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. *Experimental Gerontology*, 40(5), 416–25. DOI: [10.1016/j.exger.2005.03.010](https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.03.010)
- **Quindry J.C, Hamilton K.L, French J.P, Lee Y., Murlasits Z., Tumer N., y Powers S.K.** (2007). Exercise-induced HSP-72 elevation and

cardioprotection against infarct and apoptosis. *The Journal of Physiological Sciences*, 103(3), 1056–62. DOI: [10.1152/jappphysiol.00263.2007](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00263.2007)

- **Quindry J.C., French J., Hamilton K.L., Lee Y., Selsby J., y Powers S.** (2010). Exercise does not increase cyclooxygenase-2 myocardial levels in young or senescent hearts. *The Journal of Physiological Sciences*, 60(3), 181–6. DOI: [10.1007/s12576-009-0082-2](https://doi.org/10.1007/s12576-009-0082-2)
- **Quindry J.C., Schreiber L., Hosick P., Wrieden J., Irwin J.M., y Hoyt E.** (2010). Mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(1), H175–H183. DOI: [10.1152/ajpheart.01211.2009](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01211.2009)
- **Quindry J.C., Miller L., McGinnis G., Kliszczewicz B., Irwin J.M., Landram M., Urbiztondo Z., Nanayakkara G., y Amin R.** (2012). Ischemia reperfusion injury, K<sub>ATP</sub> channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis. *Journal of Applied Physiology (1985)*, 113(3), 498–506. DOI: [10.1152/jappphysiol.00957.2011](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00957.2011)
- **Quindry J.C. y Hamilton K.L.** (2013). Exercise and Cardiac Preconditioning Against Ischemia Reperfusion Injury. *Current Cardiology Reviews*, 9(3), 220–229. DOI: [10.2174/1573403X113099990033](https://doi.org/10.2174/1573403X113099990033)
- **Rainbow R.D., Lodwick D., Hudman D., Davies N.W., Norman R.I., y Standen N.B.** (2004). SUR2A C-terminal fragments reduce K<sub>ATP</sub> currents and ischaemic tolerance of rat cardiac myocytes. *The Journal of Physiology*, 557(3):785–94. DOI: [10.1113/jphysiol.2004.061655](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.061655)
- **Ramanathan K.B., Bodenheimer M.M., Banka V.S., y Helfant R.H.** (1977). Electrophysiologic effects of partial coronary occlusion and reperfusion. *American Journal of Cardiology*, 40(1), 50–54. DOI: [10.1016/0002-9149\(77\)90099-6](https://doi.org/10.1016/0002-9149(77)90099-6)
- **Ramires P.R., y Ji L.L.** (2001). Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *American*

*Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 28(2), H679-H688. DOI: [10.1152/ajpheart.2001.281.2.H679](https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.2.H679)

- **Ramos J.L., y Fernández C.** (2012). Fisiología del músculo cardíaco. Gasto cardíaco y transporte de oxígeno (Tema 10). En Albaladejo J. (Ed). *Volviendo a lo Básico*, versión electrónica. Cartagena: Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia. Recuperado de: [http://www.ffis.es/volviendoalobasico/12fisiologia\\_del\\_musculo\\_cardiaco.html](http://www.ffis.es/volviendoalobasico/12fisiologia_del_musculo_cardiaco.html)
- **Rensma P.L., Alessie M.A., Lammers W.J., Bonke F.I., y SchaliJ M.J.** (1988). Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circulation Research*. 62, 395–410. DOI: [10.1161/01.RES.62.2.395](https://doi.org/10.1161/01.RES.62.2.395)
- **Riascos D., Baltaxe E., y Pascual G.** (2004). La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado y perfundido. *Universitas Médica*, 45(3). Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/236319037\\_La\\_preparacion\\_de\\_Langendorff\\_corazon\\_de\\_mamifero\\_aislado\\_y\\_perfundido](https://www.researchgate.net/publication/236319037_La_preparacion_de_Langendorff_corazon_de_mamifero_aislado_y_perfundido)
- **Riccitelli M.A., Nul D.R., Sarubbi A.L., Ramos A., y Bertolasi C.A.** (1991). The clinical presentation of acute myocardial infarction predicts the severity of the lesion in the infarct-related artery. *European Heart Journal*, 12, 210-213. DOI: [10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a059870](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a059870)
- **Ripoll C., Lederer W., y Nichols C.** (1993). On the mechanism of inhibition of  $K_{ATP}$  channels by glibenclamide in rat ventricular myocytes. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 4(1), 38–47. DOI: [10.1111/j.1540-8167.1993.tb01210.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1993.tb01210.x)
- **Roden D.M., y Yang T.** (2005). Protecting the heart against arrhythmias: potassium current physiology and repolarization reserve. *Circulation*, 112(10)1376– 1378. DOI: [10.1161/CIRCULATIONAHA.105.562777](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.562777)

- **Rodríguez F., y Cabrera I.** (2014). Electrofisiología y Mecanismos Generales de las Arritmias. *Artículos de revisión*. Cuba: Hospital Universitario General Calixto García. Recuperado de: [www.revcalixto.sld.cu/index.php/ahcg/article/download/25/39](http://www.revcalixto.sld.cu/index.php/ahcg/article/download/25/39)
- **Ruffey R., Lovelace E.D., Knoebel S.B., Mueller T.M., y Zipes D.P.** (1979). Relationship between changes in left ventricular bipolar electrograms and regional myocardial blood flow during acute coronary occlusion in the dog. *Circulation Research*, 45(6), 764-770. DOI: [10.1161/01.res.45.6.764](https://doi.org/10.1161/01.res.45.6.764)
- **Sakuta H., Okamoto K., y Watanabe Y.** (1992). Blockade by antiarrhythmic drugs of glibenclamide-sensitive  $K^+$  channels in *Xenopus* oocytes. *British Journal of Pharmacology*, 107(4), 1061–1067. DOI: [10.1111/j.1476-5381.1992.tb13407.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb13407.x)
- **Sakuta H., Okamoto K., y Watanabe Y.** (1993). Antiarrhythmic drugs, clofilium and cibenzoline are potent inhibitors of glibenclamide-sensitive  $K^+$  currents in *Xenopus* oocytes. *British Journal of Pharmacology*, 109, 866–872. DOI: [10.1111/j.1476-5381.1993.tb13655.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13655.x)
- **Salguero R.** (2012). Bases Electrofisiológicas del Bloqueo Auriculoventricular. *Cuadernos de Estimulación Cardíaca. Bloqueo AV en el paciente pediátrico*, 5(13), 11-13. Recuperado de: <http://secardiologia.es/images/stories/secciones/estimulacion/cuadernos-estimulacion/13/bases-electrofisiologicas-del-bav.pdf>
- **Sanchez G., Escobar M., Pedrozo Z., Macho P., Domenech R., Härtel S., Hidalgo C., y Donoso P.** (2008). Exercise and tachycardia increase NADPH oxidase and ryanodine receptor-2 activity: possible role in cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 77(2), 380–6.). DOI: [10.1093/cvr/cvm011](https://doi.org/10.1093/cvr/cvm011)
- **Sandvik L., Erikssen J., Thaulow E., Erikssen G., Mundal R., y Rodahl K.** (1993). Physical fitness as a predictor of mortality among healthy,

middle-aged Norwegian men. *The New England Journal of Medicine*, 328(8), 533–537. DOI: [10.1056/NEJM199302253280803](https://doi.org/10.1056/NEJM199302253280803)

- **Sanguinetti M.C, Scott A.L, Zingaro GJ., y Siegel P.K.S.** (1988). BRL 34915 (cromakalim) activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in cardiac muscle. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 85, 8360-8364. DOI: [10.1073/pnas.85.21.8360](https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.8360)
- **Sanguinetti M.C., y Salata J.** (1996). Cardiac potassium channel modulators: potential for antiarrhythmic therapy. En: Evans J., Hamilton T., Longman S., Stemp G., editores. Potassium channels and their modulators. From synthesis to clinical experience. (p. 221– 256). London: Taylor & Francis.
- **Schaible, T.F., y Scheuer, J.** (1981). Cardiac function in hypertrophied hearts from chronically exercised female rats. *ZAFpL Physiol.*, 50, 1140-45
- **Scherlag B.J., El-Sherif N., Hope R., y Lazzara R.** (1974). Characterization and localization of ventricular arrhythmias resulting, from myocardial ischemia and infarction. *Circulation Research*, 35, 372-383. DOI: [10.1161/01.RES.35.3.372](https://doi.org/10.1161/01.RES.35.3.372)
- **Scheuer J., Tipton C.M.** (1977). Cardiovascular Adaptations to Physical Training. *Annual Review of Physiology*, 39, 221-251. DOI: [10.1146/annurev.ph.39.030177.001253](https://doi.org/10.1146/annurev.ph.39.030177.001253)
- **Schulman D., Latchman D.S., y Yellon D.M.** (2001). Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 281, H1630–H1636. DOI: [10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1630](https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1630)
- **Schwartz P.J. y Zipes D.P.** (2000). Autonomic modulation of cardiac arrhythmias. In: *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside* (3rd ed.) (p. 300–314). (Zipes DP and Jalife J (Eds)). Philadelphia: W. B. Saunders.

- **Segarra E.** (2006). Propiedades Fundamentales del Corazón. *Fisiología de los Aparatos y Sistemas*, (p.p.174-475). España: Editor Universidad de Cuenca. ISBN: 9978141200, 9789978141205.
- **Seino S., y Miki T.** (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 81,133–176. DOI: [10.1016/S0079-6107\(02\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(02)00053-6)
- **Shaw R.M., y Rudy Y.** (1997) Electrophysiologic effects of acute myocardial ischemia. A mechanistic investigation of action potential conduction and conduction failure. *Circulation Research*, 80(1), 124–138. DOI: [10.1161/01.res.80.1.124](https://doi.org/10.1161/01.res.80.1.124)
- **Shimizu W., Kurita T., Matsuo K., Suyama K, Aihara N., Kamakura S., Towbin J.A., y Shimomura K.** (1998). Improvement of repolarization abnormalities by a K<sup>+</sup> channel opener in the LQT1 form of congenital long QT syndrome. *Circulation*, 97(16), 1581–1588. DOI: [10.1161/01.cir.97.16.1581](https://doi.org/10.1161/01.cir.97.16.1581)
- **Shinmura K., Xuan Y.T., Tang X.L., et al.** (2002). Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circulation Research*, 90, 602–608. DOI: [10.1161/01.RES.0000012202.52809.40](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000012202.52809.40)
- **Spruce A.E., Standen N.B., y Stanfield P.R.** (1985). Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature*, 316(6030), 736-738. DOI: [10.1038/316736a0](https://doi.org/10.1038/316736a0)
- **Sridhar A., Nishijima Y., Terentyev D., Terentyeva R., Uelman R., Kukielka M., Bonilla I.M., Robertson G.A., Gyorke S., Billman G.E., y Carnes C.A.** (2008). Repolarization abnormalities and afterdepolarizations in a canine model of sudden cardiac death. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(5), R1463–R1472, DOI: [10.1152/ajpregu.90583.2008](https://doi.org/10.1152/ajpregu.90583.2008)

- **Standen N.B., Quayle J.M., Davies N.W., Brayden J.E., Huang Y., Nelson M.T.** (1989). Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science*, 245(4914), 177-180. DOI: [10.1126/science.2501869](https://doi.org/10.1126/science.2501869)
- **Starnes J.W., y Bowles D.K.** (1995). Role of exercise in the cause and prevention of cardiac dysfunction. *Exercise and Sport Sciences Review*, 23, 349–373. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556356>
- **Starnes J.W, Taylor R.P., y Park Y.** (2003). Exercise improves postischemic function in aging hearts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 285, H347–51. DOI: [10.1152/ajpheart.00952.2002](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00952.2002)
- **Starnes J.W., Taylor R.P., y Ciccolo J.T.** (2005). Habitual low-intensity exercise does not protect against myocardial dysfunction after ischemia in rats. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*, 12(2), 169–174. DOI: [10.1097/01.hjr.0000159319.62466.95](https://doi.org/10.1097/01.hjr.0000159319.62466.95)
- **Starnes J.W. y Taylor R.P.** (2007). Exercise-induced cardioprotection: endogenous mechanisms. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 39(9),1537-1543. DOI: [10.1249/mss.0b013e3180d099d4](https://doi.org/10.1249/mss.0b013e3180d099d4)
- **Steel, J.D., Beilharz, R.G., Stewart, G.A., Goddard, M.** (1977). The inheritance of heart score in racehorses. *Anstr. VeL J.*, 53, 306-309).
- **Stern M.D., Silverman H.S., Houser S.R., Josephson R.A., Capogrossi M.C., Nichols C.G., Lederer W.J., y Lakatta EG.** (1998). Anoxic contractile failure in rat heart myocytes is caused by failure of intracellular calcium release due to alteration of the action potential. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 85(18), 6954-6958. DOI: [10.1073/pnas.85.18.6954](https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6954)
- **Stewart J.R., Burmeister W.E., Burmeister J., y Lucchesi B.R.** (1980). Electrophysiologic and antiarrhythmic effects of phentolamine in

experimental coronary artery occlusion and reperfusion in the dog. *Journal Cardiovascular of Pharmacology*, 2(1), 77–91. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6154207?dopt=Abstract>

- **Stoller D, Kakkar R, Smelley M, Chalupsky K, Earley JU, Shi NQ, et al.** (2007). Mice lacking sulfonylurea receptor 2 (SUR2) ATP-sensitive potassium channels are resistant to acute cardiovascular stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 43(4), 445–454. DOI: [10.1016/j.yjmcc.2007.07.058](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.07.058)
- **Strohmenger H.U., Lindner K.H. y Brown C.G.** (1997). Analysis of the ventricular fibrillation ECG signal amplitude and frequency parameters as predictors of countershock success in humans. *Chest*, 111(3), 584-589. DOI: [10.1378/chest.111.3.584](https://doi.org/10.1378/chest.111.3.584).
- **Strohmenger H.U., Lindner K.H., y Brown C.G.** (1997). Analysis of the ventricular fibrillation ECG signal amplitude and frequency parameters as predictors of countershock success in humans. *Chest*, 111(3), 584-9. DOI: [10.1378/chest.111.3.584](https://doi.org/10.1378/chest.111.3.584)
- **Such L., Rodríguez A., Alberola A., Lopez L., Ruiz R., Artal L., Pons I., Pons M.L., García C., y Chorro F.J.** (2002). Intrinsic changes on automatism, conduction, and refractoriness by exercise in isolated rabbit heart. *Journal of Applied Physiology* (1985), 92(1), 225-229.
- **Such L., Alberola A.M., Such-Miquel L., Lopez L., Trapero I., Pelechano F., Gomez-Cabrera M.C., Tormos A., Millet J., y Chorro F.J.** (2008). Effect of Chronic Exercise on Myocardial Refractoriness: a study on isolated rabbit heart. *Acta Physiologica*, 193(4), 331-339. DOI: [10.1111/j.1748-1716.2008.01851.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01851.x)
- **Such-Miquel L., Cebriá A., Díaz B., López L., Trapero I., Pelechano F., Parra G., Alberola A., Such L., y Chorro F.J.** (2008). Effect of Physical training on intrinsic electrophysiological stability of ventricular

myocardium. *ESC Congress 2008 European Heart Journal*, 29, Abstract Supplement 532.

- **Such-Miquel L., Del Canto I., Zarzoso M., Brines L., Soler C., Parra G., Guill A., Alberola A., Such L. y Chorro F.J.** (2018). Effects of S-Nitrosoglutathione on Electrophysiological Manifestations of Mechanoelectric Feedback. *Cardiovascular Toxicology*, 18(6), 520-529. DOI: [10.1007/s12012-018-9463-1](https://doi.org/10.1007/s12012-018-9463-1).
- **Such-Miquel, L.** (2005). Efectos electrofisiológicos miocárdicos intrínsecos producidos por la inhibición del sistema de intercambio sodio-protón, en condiciones de normoxia, y tras la isquemia miocárdica regional. Estudio experimental (tesis doctoral). Universitat de València, Valencia.
- **Sutton P., Taggart P., Opthof T., Coronel R., Trimlett R., Pugsley W., y Kallis P.** (2000). Repolarisation and refractoriness during early ischaemia in humans. *Heart*, 84, 365–369. DOI: [10.1136/heart.84.4.365](https://doi.org/10.1136/heart.84.4.365)
- **Suzuki M., Sasaki N., Miki T., Sakamoto N., Ohmoto-Sekine Y., Tamagawa M., et al.** (2002). Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(4), 509–516. DOI: [10.1172/JCI14270](https://doi.org/10.1172/JCI14270)
- **Taggart P., Sutton P.M.I., Spear D.W., Drake H.F., Swanton R.H., y Emanuel R.W.** (1988). Simultaneous endocardial and epicardial monophasic action potential recordings during brief periods of coronary artery ligation in the dog: Influence of adrenaline, beta blockade and alpha blockade. *Circulation Research*, 22, 900-909. DOI: [10.1093/cvr/22.12.900](https://doi.org/10.1093/cvr/22.12.900)
- **Tamargo J., Caballero R., Gómez R., Valenzuela C., y Delpón E.** (2004). Review: Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research*, 62(1), 9 – 33. DOI: [10.1016/j.cardiores.2003.12.026](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.026)
- **Tamayo L.** (2007). Bloqueo de los canales de potasio en el shock séptico: ¿otra esperanza perdida? *Medicina Intensiva*, 31(5), 251-257. DOI: [10.1016/S0210-5691\(07\)74818-0](https://doi.org/10.1016/S0210-5691(07)74818-0)

- **Tan H.L., Mazon P., Verberne H.J., et al.** (1993). Ischaemic preconditioning delays ischaemia induced cellular electrical uncoupling in rabbit myocardium by activation of ATP sensitive potassium channels. *Cardiovascular Research*, 27(4), 644–651. DOI: [10.1093/cvr/27.4.644](https://doi.org/10.1093/cvr/27.4.644)
- **Tanganuichi J., Noma A., y Irisawa H.** (1983). Modification of the cardiac action potential by intracellular injection of adenosine triphosphate and related substances in guinea-pig single ventricular cells. *Circulation Research*, 53(2), 131-139. DOI: [10.1161/01.res.53.2.131](https://doi.org/10.1161/01.res.53.2.131)
- **Taylor T.G., Venable P.W., Shibayama J., Warren M., y Zaitsev A.V.** (2012). Role of K<sub>ATP</sub> channel in electrical depression and asystole during long-duration ventricular fibrillation in ex vivo canine heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*, 302(11), H2396–H2409. DOI: [10.1152/ajpheart.00752.2011](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00752.2011).
- **Tibbits G.F., Barnard R.J., Baldwin K.M., Cugalj N., y Roberts N.K.** (1981). Influence of exercise on excitation-contraction coupling in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 240(4), H472–H480.
- **Tormos A., Chorro F.J., Millet J., Such L., Cánoves J., Mainar L., Trapero I., Such-Miquel L., Guill A., y Alberola A.** (2008). Analyzing the electrophysiological effects of local epicardial temperature in experimental studies with isolated hearts. *Physiol Meas.* 29(7), 711–728.
- **Trapero I., Chorro F.J., Such-Miquel L., Cánoves J., Tormos A., Pelechano F., López L., y Such L.** (2008). Effect of streptomycin on stretch-induced change in myocardial activation during ventricular fibrillation. *Revista Española de Cardiología*, 61(2), 201–205.
- **Tseng G-N., y Hoffman B.F.** (1990). Actions of pinacidil on membrane currents in canine ventricular myocytes and their modulation by intracellular ATP and cAMP. *Pflugers Archive: European Journal of Physiology*, 415(4), 414-424. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2156217>.

- **Uchicagokidshospital.org.** Anatomía y función del sistema eléctrico del corazón. *Transtornos Cardiovasculares*. Estados Unidos: The University Of Chicago Medicine, Comer Children's Hospital. Recuperado de: <http://healthlibrary.uchospitals.edu/content/pediatric-diseases-and-conditions-v0/anatomy-and-function-of-the-electrical-system/>
- **Vajda S., Baczkó I., y Leprán I.** (2007). Selective cardiac plasma-membrane  $K_{ATP}$  channel inhibition is desfibrillatory and improves survival during acute myocardial ischemia and reperfusion. *European Journal of Pharmacology*, 577, 115-123. DOI: [10.1016/j.ejphar.2007.08.016](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.08.016).
- **Vega, R.B., Konhilas, J.P., Kelly, D.P., y Leinwand, L.A.** (2017). Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise. *Cell Metabolism*, 25(5), 1012–1026. DOI: [10.1016/j.cmet.2017.04.025](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.025).
- **Verdouw P.D., van den Doel M.A., Zeeuw S., y Duncker D.J.** (1998). Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovascular Research*, 39, 121-35. DOI: [10.1016/s0008-6363\(98\)00069-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00069-8).
- **Vleugels J.A., Vereecke J., y Carmeliet E.** (1980). Ionic currents during hypoxia in voltage-clamped cat ventricular muscle. *Circulation Research*, 47(4), 501-508. DOI: [10.1161/01.res.47.4.501](https://doi.org/10.1161/01.res.47.4.501).
- **Wang D.W., Sato T., y Arita M.** (1995). Voltage-dependent inhibition of ATP sensitive potassium channels by flecainide in guinea pig ventricular cells. *Cardiovascular Research*, 29(4), 520–525. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7796446>.
- **Wang, L., Wang, J., Cretoiu, D., Li, G., y Xiao, J.** (2020). Exercise-mediated regulation of autophagy in the cardiovascular system. *Journal of Sport and Health Science*, 9(3), 203–210. DOI: [10.1016/j.jshs.2019.10.001](https://doi.org/10.1016/j.jshs.2019.10.001).
- **Wang, X., y Fitts, R. H.** (2018). Effects of regular exercise on ventricular myocyte biomechanics and  $K_{ATP}$  channel function. *American Journal of*

*Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 315(4), H885–H896. DOI: [10.1152/ajpheart.00130.2018](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00130.2018)

- **Wannamethee S.G. y Shaper A.G.** (2001). Physical Activity in the Prevention of Cardiovascular Disease. An Epidemiological Perspective. *Sports Medicine*, 31(2), 101–114. DOI: [10.2165/00007256-200131020-00003](https://doi.org/10.2165/00007256-200131020-00003).
- **West, J.B.** (Ed.). (1998). Best y Taylor, Bases fisiológicas de la práctica médica. (12a ed.). México, México: Editorial Médica Panamericana.
- **Wijffels M.C., Kirchhof C.J., Dorland R., y Allessie M.A.** (1995). Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. Oct 1;92(7):1954-68. DOI: [10.1161/01.cir.92.7.1954](https://doi.org/10.1161/01.cir.92.7.1954)
- **Wilde A.A.** (1993). Role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel current in ischemic arrhythmias. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 7(3), 521-6. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8251422>
- **Wilde A.A. y Aksnes G.** (1995). Myocardial potassium loss and cell depolarisation in ischaemia and hypoxia. *Cardiovascular Research*, 29(1), 1-15. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7895226>
- **Williams D.O., Scherlag B.J., Hope R., El-Sherif N., y Lazzara R.** (1974). The pathophysiology of malignant ventricular arrhythmias during acute myocardial infarction. *Circulation*, 50, 1163-1172.
- **Wolk R., Cobbe S.M., Hicks M.N. y Kane K.A.** (1998). Effects of lignocaine on dispersion of repolarisation and refractoriness in a working rabbit heart model of regional myocardial ischaemia. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*, 31(2), 253–261. DOI: [10.1097/00005344-199802000-00011](https://doi.org/10.1097/00005344-199802000-00011)

- **Wyatt, H.L., Chuck, L., Rabinowitz, B., Tyberg, J.V., Parmley, W.W.** (1978). Enhanced cardiac response to catecholamines in physically trained cats. *American Journal of Physiology*, 234, H608-613).
- **Yamashita N., G Baxter G., y Yellon D.** (2001). Exercise directly enhances myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion injury in the rat through a protein kinase C mediated mechanism. *Heart*, 85(3), 331–336. DOI: [10.1136/heart.85.3.331](https://doi.org/10.1136/heart.85.3.331)
- **Yamazaki J., y Hume, J.R.** (1997). Inhibitory effects of glibenclamide on cystic fibrosis transmembrane regulator, swelling-activated, and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels in mammalian cardiac myocytes. *Circulation Research*, 81(1), 101–109. DOI: [10.1161/01.res.81.1.101](https://doi.org/10.1161/01.res.81.1.101).
- **Yang Z., Zhang H., Kong S., Yue X. F., Jin Y. B., Jin J., y Huang Y. C.** (2007). Study for relevance of the acute myocardial ischemia to arrhythmia by the optical mapping method. *Physiological measurement*, 28(5), 481–488. DOI: [10.1088/0967-3334/28/5/003](https://doi.org/10.1088/0967-3334/28/5/003)
- **Yang M.K., Lee S.H., Seo H.W., Yi K.Y., Yoo S.E., Lee B.H., Chung H.J., Won H.S., Lee C.S., Choi W.S., y Shin H.S.** (2009). KR-31761, a Novel  $\text{K}^+$ <sub>ATP</sub>-Channel Opener, Exerts Cardioprotective Effects by Opening Both Mitochondrial  $\text{K}^+$ <sub>ATP</sub> and Sarcolemmal  $\text{K}^+$ <sub>ATP</sub> Channels in Rat Models of Ischemia/Reperfusion-Induced Heart Injury. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109(2), 222-232, ISSN 1347-8613. DOI:[10.1254/jphs.08132FP](https://doi.org/10.1254/jphs.08132FP).
- **Yao Z., y Gross G.J.** (1993). Glibenclamide antagonizes adenosine A1 receptor-mediated cardioprotection in stunned canine myocardium. *Circulation* 88(1), 235–244. DOI: [10.1161/01.CIR.88.1.235](https://doi.org/10.1161/01.CIR.88.1.235)
- **Yao Z. y Gross G.J.** (1994a) The ATP-dependent potassium channel: an endogenous cardioprotective mechanism. *Journal Cardiovascular Pharmacology*, 24(4), S28-34. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7898105>

- **Yao Z. y Gross G.J.** (1994b). A comparison of adenosine-induced cardioprotection and ischemic preconditioning in dogs. Efficacy, time course, and role of  $K_{ATP}$  channels. *Circulation*, 89(3), 1229–1236. DOI: [10.1161/01.CIR.89.3.1229](https://doi.org/10.1161/01.CIR.89.3.1229)
- **Yellen G.** (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419, 35–42. DOI: [10.1038/nature00978](https://doi.org/10.1038/nature00978)
- **Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., et al.** (1998). ATP-sensitive  $K^+$  channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology*, 274(1), C25–C37. DOI: [10.1152/ajpcell.1998.274.1.C25](https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.1.C25)
- **Zaitsev A.V., Berenfeld O., Sergey F. Mironov S.F., Jalife J., y Arkady M. Pertsov A.M.** (2000). Distribution of Excitation Frequencies on the Epicardial and Endocardial Surfaces of Fibrillating Ventricular Wall of the Sheep Heart. *Circulation Research*, 86, 408–417. DOI: [10.1161/01.RES.86.4.408](https://doi.org/10.1161/01.RES.86.4.408).
- **Zaitsev A.V., Guha P.K., Sarmast F., Kolli A., Berenfeld O., Pertsov A.M., De Groot J.R. Coronel R., Jalife J.** (2003). Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circulation Research*, 92, 546–553. DOI: [10.1161/01.RES.0000061917.23107.F7](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000061917.23107.F7)
- **Zarzoso, M., Such-Miquel, L., Parra, G. et al.** (2012). The training-induced changes on automatism, conduction and myocardial refractoriness are not mediated by parasympathetic postganglionic neurons activity. *European Journal of Applied Physiology*, 112, 2185–2193 DOI: [10.1007/s00421-011-2189-4](https://doi.org/10.1007/s00421-011-2189-4).
- **Zhang H., Flagg T.P y Nichols C.G.** (2010). Cardiac sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels: Latest twists in a questing tale!. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1), 71–75. DOI: [10.1016/j.yjmcc.2009.07.002](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.07.002)

- **Zhang H., Holden A.V., y Boyett M.R.** (2002). Sustained inward current and pacemaker activity of mammalian sinoatrial node. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 13(8), 809-812.
- **Zingman L. V., Hodgson D. M., Bast P. H., Kane G. C., Perez-Terzic C., Gumina R. J., ... Terzic, A.** (2002). Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 13278–13283. DOI:10.1073/pnas.212315199
- **Zipes D.P., y Wellens J.J.** (1998). Sudden Cardiac Death. *Circulation*, 98,2334–2351 DOI: [10.1161/01.CIR.98.21.2334](https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.21.2334).
- **Zipes D.P., y Jalife J (Eds).** (2006). *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside* (5th Ed). Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company.