

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLOGIA

TESIS DOCTORAL

**EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA
DESACETILACIÓN DE LAS HISTONAS EN EL
REMODELADO POST-INFARTO DEL SUSTRATO
ARRITMOGÉNICO.**

Presentada por:

Patricia Genovés Martínez

Dirigida por:

Dr. D. Francisco Javier Chorro Gascó.

Dr. D. Luis Such Belenguer.

Dra. Dña. Irene del Canto Serrano

Valencia, enero de 2021

D. **Francisco Javier Chorro Gascó**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universitat de València y jefe del Servicio de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

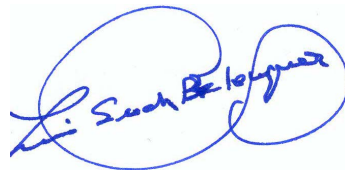
D. **Luis Such Belenguer**, Profesor Emérito del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

Dña. **Irene del Canto Serrano**, Investigadora Postdoctoral del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “Efectos de la inhibición de la desacetilación de las histonas en el remodelado post-infarto del sustrato arritmogénico”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Patricia Genovés Martínez, 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 15 enero de 2021.



Fdo. F. Javier Chorro Gascó Fdo. Luis Such Belenguer Fdo. Irene del Canto Serrano

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por el Instituto de Salud Carlos III (CB16/11/00486; PI15/01408; PIE15/0001 y PI18/01620) y por la Generalitat Valenciana a través del programa Prometeo (PROMETEO / 2018 / 078).

A mi querida Lili

A mis padres

En la vida, no hay nada que temer,
solo hay que comprender.

Marie Curie

Agradecimientos:

A mis directores de tesis:

A Javier Chorro, por transmitirme su experiencia y sus conocimientos. Por su constante apoyo, desinterés y generosidad.

A Luis Such, por acogerme en el grupo y transmitirme la pasión por la investigación y el conocimiento.

A Irene del Canto, por acompañarme y ayudarme en este camino aconsejándome en el arduo mundo de la investigación.

A todas aquellas personas que han trabajado y me han ayudado durante este recorrido, especialmente:

A Antonio, por tener siempre las palabras adecuadas, por su gran ayuda e inolvidables relatos.

A Óscar, porque sin él este proyecto no hubiera sido lo mismo. Por su constante apoyo y no dejarme rendir nunca.

A Germán y Luis Jr. por su ayuda durante todo el proyecto. Por esos ratos y conversaciones que hemos compartido.

A Manolo, por enseñarme la importancia del trabajo bien hecho.

A Ana y Eva, por volcarse desde el primer momento en este proyecto y proporcionarnos toda su ayuda.

Al personal de la UCIM por estar siempre pendiente de nosotros.

Al grupo del Dr. Bodí, por su ayuda incondicional. A César y Jose, por estar siempre dispuestos a colaborar.

Al Dpto. de Farmacología de la Universitat de València, Alberto, Dulce y Pedro, por ayudarnos cuando más lo necesitábamos.

A Marta, por su constante ánimo y a Toni, por su encomiable aportación en este proyecto.

A mi familia. A mis padres, por dárme todo y guiarme. Sin ellos no sería la persona que soy. A mi hermano David y a Cristina, por su constante ánimo, apoyo y por regalarnos a Carlota.

A Miguel Ángel, por llegar a mi vida para quedarse, por su cariño y complicidad. Por creer en mí.

A mis amigas, por crecer a mi lado todos estos años.

A todos mis familiares y amigos que me han ayudado, apoyado, y animado constantemente. Agradezco todo el interés y el cariño que me ha sido brindado durante este recorrido.

A los que ya no están, mi yaya, mi tía, mi Lili y mi amigo Javi, vuestro recuerdo siempre permanecerá en mi corazón.

Resumen

Se ha investigado, en un modelo de infarto crónico (seis semanas) en conejo, el efecto de un inhibidor de las desacetilasas de histonas, el ácido valproico, sobre la magnitud del miocardio infartado y sobre determinadas propiedades electrofisiológicas y mecánicas del miocardio ventricular. El modelo experimental de infarto ha sido desarrollado en conejos macho Nueva Zelanda, toracotomizados y anestesiados a los que se les ocluyó la arteria coronaria circunfleja (una hora) a mitad de su trayecto epicárdico, seguida de perfusión. Tras seis semanas de evolución del proceso necrótico, se sacrificó a los conejos, se les extrajo el corazón y se ubicó en un sistema de perfusión tipo Langendorff, para proceder al estudio electrofisiológico mediante la ubicación, en el epicardio ventricular izquierdo, de una placa multielectrodo (256 electrodos) de registro, de un electrodo de registro auricular y otro de estimulación ventricular. Las determinaciones fueron: 1.- Periodos refractarios ventriculares efectivo y funcional, mediante la aplicación del test del extra-estímulo; 2- Inducibilidad de fibrilación ventricular, aplicando el test del extra-estímulo en cuatro diferentes zonas del ventrículo; 3.- Parámetros determinados durante la fibrilación ventricular (sin interrumpir la perfusión): Periodo refractario funcional (percentil 5 de los intervalos fibrilatorios), coeficiente de variación del periodo refractario; 4.- La extensión del infarto mediante tinción macroscópica, finalizado el estudio electrofisiológico. Durante el periodo de evolución del infarto y antes del estudio electrofisiológico se determinaron indicadores bioquímicos de lesión miocárdica, en plasma, y se efectuaron controles ecocardiográficos. Los resultados y las conclusiones en base a los resultados fueron: 1) El modelo de infarto desarrollado, validado con indicadores bioquímicos en plasma e identificación por tinción macroscópica, ha posibilitado la realización del presente estudio y se considera que puede ser de interés para

investigaciones de características similares; 2) el ácido valproico ha exhibido un efecto protector manifestado por su capacidad para reducir la magnitud del daño miocárdico; 3) el ácido valproico ha mostrado capacidad para prevenir el desencadenamiento de la fibrilación ventricular; 4) la protección anti arrítmica exhibida por el ácido valproico puede relacionarse con su capacidad para reducir la heterogeneidad electrofisiológica, evidenciada en el presente trabajo; 5) el efecto beneficioso del ácido valproico se ha manifestado asimismo sobre el remodelado ventricular. Por tanto, se concluye de modo general que el ácido valproico ha exhibido un efecto protector sobre el miocardio isquémico. Dicho efecto protector podría estar ligado a la prevención de la fibrosis derivada de su capacidad para inhibir las desacetilasas de histonas.

Índice

Abreviaturas.....	V
Lista de figuras.....	VII
Lista de tablas.....	XIII
1. Introducción.....	1
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Justificación de los objetivos (antecedentes).....	4
1.2.1 El infarto de miocardio.....	4
1.2.1.1 Introducción.....	4
1.2.1.2 Fisiopatología de la isquemia miocárdica. Evaluación hacia el infarto.....	8
1.2.1.2.1. Alteraciones que acontecen en el miocardio isquémico	8
1.2.1.2.2. Infarto de miocardio. La transición de la isquemia a la necrosis.....	15
1.2.1.2.3. Mecanismos que promueven la muerte de los cardiomiocitos.....	18
1.2.1.3 Modificaciones por la reperfusión.....	21
1.2.1.4 Proceso de cicatrización del tejido cardíaco dañado.....	26
1.2.1.4.1. Fase inflamatoria del proceso de cicatrización.....	27
1.2.1.4.2. Fase proliferativa del proceso de cicatrización.....	31
1.2.1.4.3. Fase de maduración del proceso de cicatrización.....	37
1.2.1.5. Estudio especial del proceso fibrótico en el infarto miocárdico.....	40
1.2.1.5.1. Análisis especial del papel de la fibrosis en la génesis de arritmias.....	47
1.2.1.5.2. Papel de la fibrosis en la conducción lenta.....	53
1.2.1.5.3. Papel de la fibrosis en el bloqueo unidireccional de la conducción.....	54
1.2.1.5.4. Efectos proarrítmicos de los fibroblastos/miofibroblastos en los cardiomiocitos.....	55
1.2.2. Papel de las desacetilasas de histonas en la fibrosis.....	58
1.2.2.1. Inhibición de las desacetilasas de histonas en el contexto de la protección del miocardio.....	64
1.2.2.1.1. Generalidades sobre la protección miocárdica.....	64
1.2.2.1.2. Inhibidores de las desacetilasas de histonas: nuevas perspectivas.....	70

1.2.2.1.3. El ácido valproico como agente terapéutico en la protección miocárdica	75
1.3. Resumen de la justificación de los objetivos e hipótesis de trabajo...	79
1.4. Plan de trabajo.....	80
2. Material y métodos.....	81
2.1. Materiales.....	83
2.1.1. Animales de experimentación	83
2.1.2. Fármacos y materiales empleados en el quirófano experimental para la realización del modelo experimental de infarto agudo de miocardio.....	84
2.1.3. Fármacos, reactivos y materiales empleados para la realización del protocolo de electrofisiología cardiaca experimental.....	87
2.1.4. Reactivos y materiales empleados para la realización del protocolo histológico	92
2.1.5. “Software”	92
2.2. Métodos.....	96
2.2.1. Grupos experimentales	96
2.2.2. Metodología para el desarrollo del modelo experimental de infarto agudo de miocardio en conejos	97
2.2.2.1. Fase prequirúrgica	98
2.2.2.2. Fase quirúrgica.....	99
2.2.2.3. Fase postquirúrgica	102
2.2.2.4. Estudio ecocardiográfico	105
2.2.2.5. Administración del ácido valproico en el grupo tratado....	106
2.2.3. Estudio electrofisiológico.....	106
2.2.3.1. Aislamiento y perfusión del corazón	106
2.2.3.2. Disposición de electrodos para el protocolo electrofisiológico	107
2.2.4. Determinación de los parámetros electrofisiológicos	108
2.2.4.1. Parámetros de refractariedad	109
2.2.4.1.1. Determinación de los parámetros electrofisiológicos de refractariedad a partir del test del extraestímulo ventricular.....	109
2.2.4.1.2. Determinación de los parámetros electrofisiológicos de refractariedad durante la fibrilación ventricular.....	111
2.2.4.2. Parámetros de heterogeneidad electrofisiológica	117
2.2.4.3. Validación de los registros de fibrilación ventricular obtenidos con los diferentes electrodos.....	119
2.2.4.4. Inducibilidad de arritmias	121
2.2.5. Determinación del tamaño del infarto	122

2.2.6. Resumen del protocolo experimental	125
2.2.7. Análisis estadístico	127
2.2.8. Legislación	128
3. Resultados.....	129
3.1. Marcadores bioquímicos de necrosis, en suero.....	131
3.2. Estudio ecocardiográfico	132
3.3. Tamaño del infarto y área de riesgo.....	136
3.4. Estudio electrofisiológico	138
3.4.1. Análisis de la refractariedad miocárdica	138
3.4.1.1. Periodos refractario efectivo y funcional determinados con el TEEV	138
3.4.1.2. Intervalos VV durante la FV.....	139
3.4.1.3. Percentil 5	140
3.4.1.4. Frecuencia dominante	141
3.4.2. Análisis de la heterogeneidad miocárdica	143
3.4.2.1. Coeficiente de variación de los periodos refractarios efectivo y funcional	143
3.4.2.2. Coeficiente de variación de los intervalos VV	144
3.4.2.3. Coeficiente de variación del P5	145
3.4.2.4. Coeficiente de variación de la frecuencia dominante	145
3.4.2.5. Concentración espectral.....	146
3.4.3. Análisis de la inducibilidad de la fibrilación ventricular	148
3.4.4. Relación entra la inducibilidad de FV y la refractariedad.....	151
3.4.5. Relación entre la inducibilidad de arritmias y la heterogeneidad electrofisiológica	153
3.4.6. Análisis bivariado en relación con la inducibilidad de FV	156
3.4.7. Análisis multivariado en relación con la inducibilidad de FV ..	157
4. Discusión	159
4.1. Consideraciones relativas a los materiales y métodos empleados	161
4.1.1. Respecto a la idoneidad de la especie seleccionada	161
4.1.2. Respecto a la metodología para la producción del infarto agudo de miocardio.....	165
4.1.3. Respecto al cuidado de los animales	168
4.1.4. Respecto al sistema de perfusión de Langendorff.....	169
4.1.5. Respecto a la metodología empleada para la determinación de los parámetros electrofisiológicos.....	171

4.1.6. Respecto a la metodología empleada para la evaluación del daño miocárdico	172
4.1.7. Sobre la cuantificación del tamaño del infarto	175
4.2. Consideraciones relativas a los resultados obtenidos	177
4.2.1. Respecto a la extensión del daño miocárdico, la función cardíaca y las características del área dañada	177
4.2.2. Respecto a los resultados del estudio electrofisiológico	181
4.3. Limitaciones del estudio	177
5. Conclusiones.....	189
6. Referencias bibliográficas	193
7. Publicaciones	219

Abreviaturas

AD: Apical derecha

AI: Apical izquierda

AV: Ácido valproico

BD: Basal derecha

BI: Basal izquierda

CE: Concentración espectral

CV: Coeficiente de variación

DADs: Despolarizaciones diastólicas tardías

DdVI: Diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo.

DsVI: Diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo.

EADs: Despolarizaciones diastólicas tempranas

EE: Extraestímulo

FD: Frecuencia dominante

FE: Fracción de eyección ventricular izquierda

FO: Grupo falso operado

FV: Fibrilación ventricular

HAT: Histonas acetiltransferasas

HDAC: Desacetilasas de histonas

ICaL: Corriente de calcio tipo L

IKf: Corriente rectificadora de potasio rápida

IKs: Corriente rectificadora de potasio retardada

IL-1 β : Interleuquina-1- β

IM: Infarto de miocardio

Ito: Corriente transitoria de potasio

LCS: Longitud del ciclo sinusal

MMP: Metaloproteinasas de la matriz

MEF2: Factor potenciador de miocitos-2

PRE: Periodo refractario efectivo

PRF: Periodo refractario funcional

P5: Percentil 5

TEEV: Test del extraestímulo ventricular

TGF- β : Factor de crecimiento transformante- β

TNF: Factor de necrosis tumoral

TnT: Troponina cardiaca T

VV: Intervalo de activación ventricular

α -SMA: α -actina de músculo liso

Lista de figuras

Figura 1.1: Representación de las diferentes causas de muerte para todas las edades en mujeres y hombres	5
Figura 1.2: Esquema de las diferentes formas de presentación de la cardiopatía isquémica	7
Figura 1.3: Progresión del daño miocárdico en función de la duración de la oclusión coronaria	16
Figura 1.4: Progresión del daño miocárdico desde el subendocardio hasta el subepicardio.	18
Figura 1.5: Reacción inflamatoria que tiene lugar tras el infarto de miocardio	31
Figura 1.6: Diferentes tipos celulares que pueden diferenciarse en miofibroblastos.	35
Figura 1.7: Síntesis de colágeno en diferentes regiones del tejido cardiaco tras un infarto de miocardio.	45
Figura 1.8: Representación de una reentrada anatómica.	49
Figura 1.9: Patrones de fibrosis cardiaca	50
Figura 1.10: Diferentes tipos de fibrosis y sus consecuencias arritmogénicas.	52
Figura 1.11: Mecanismos arritmogénicos de las interacciones entre los cardiomiocitos y fibroblastos	57
Figura 1.12: Esquema de las propiedades antifibróticas de los inhibidores de las desacetilasas histonas	75
Figura 2.1: Electrodo múltiple de registro ventricular empleado en los experimentos de la presente tesis doctoral	89
Figura 2.2: Preparación experimental del modelo de corazón aislado y perfundido de conejo mediante el sistema Langendorff.	91
Figura 2.3: A) Programa <i>Pacemap</i> con diferentes electrogramas con un registro en ritmo sinusal y B) Matriz de correspondencia electrodo-canal del electrodo múltiple	93
Figura 2.4: Ejemplo de la matriz multielectrodo con distintos valores de frecuencia dominante en el programa <i>Matlab</i>	94

Figura 2.5: A) Ejemplo de un archivo procesado en el programa <i>Marcar Z</i> y B) Ejemplo de las marcas de activación en distintos registros ventriculares, visualizadas en el programa <i>Pacemap</i>	94
Figura 2.6: Ejemplo de un archivo procesado en el programa “ <i>Estadísticas M</i> ”	95
Figura 2.7: Esquema de las fases del procedimiento quirúrgico experimental	97
Figura 2.8: Esquema con la posición de la ligadura coronaria en la arteria coronaria circunfleja del ventrículo izquierdo.	101
Figura 2.9: Esquema de la ubicación de los electrodos de estimulación ventricular alrededor de la zona infartada.	108
Figura 2.10: Electrogramas ventriculares durante el test del extraestímulo ventricular	110
Figura 2.11: Electrogramas ventriculares donde se presentan el extraestímulo y la respuesta ventricular	110
Figura 2.12: A) Medida del periodo refractario efectivo y B) Medida del periodo refractario funcional determinado con la aplicación del test del extraestímulo ventricular	111
Figura 2.13: Registro electrográfico de un episodio de fibrilación ventricular	112
Figura 2.14: Registros durante la fibrilación ventricular con las marcas en cada instante de activación local miocárdica.	113
Figura 2.15: Determinación del intervalo V-V en un electrograma ventricular	113
Figura 2.16: Determinación del percentil 5	114
Figura 2.17: A) Ejemplo de la descomposición de la señal fibrilatoria en sus distintos armónicos y B) Señal temporal de un trazado fibrilatorio con su correspondiente espectro de frecuencia	115
Figura 2.18: Ejemplo de las tres zonas de estudio seleccionadas en la matriz multielectrodo	116
Figura 2.19: Ejemplo de las tres zonas de estudio seleccionadas en la matriz multielectrodo en el grupo falso operado	117

Figura 2.20: Representación de dos electrogramas y sus correspondientes espectros de potencia	119
Figura 2.21: Ejemplo de registros electrocardiográficos en fibrilación ventricular en un caso del grupo control	120
Figura 2.22: Test del extraestímulo ventricular realizado con uno, dos y tres extraestímulos	121
Figura 2.23: Desencadenamiento de la fibrilación ventricular durante la aplicación del test del extraestímulo ventricular	121
Figura 2.24: A y B) Dispositivo diseñado para realizar las secciones del corazón. C) Muestra de las secciones transversales del corazón	122
Figura 2.25: Muestra de una rodaja de corazón seccionado con las distintas tinciones empleadas en el grupo falso operado, control y tratado	123
Figura 2.26: Representación esquemática de las secciones del corazón donde se analiza el tamaño del infarto	124
Figura 2.27: Esquema del protocolo electrofisiológico aplicado	126
Figura 3.1: Representación de los valores de la troponina cardiaca T ..	132
Figura 3.2: A) Representación de los valores del diámetro telediastólico y B) del diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo	133
Figura 3.3: Representación de los valores de la fracción de eyección ..	134
Figura 3.4: Imágenes en modo M del ventrículo izquierdo con distintos parámetros ecocardiográficos	135
Figura 3.5: A) Secciones del ventrículo izquierdo con el área infartada en cada grupo experimental, B) representación de los valores del tamaño del infarto respecto al ventrículo izquierdo y C) respecto al área de riesgo	136
Figura 3.6: A) Secciones del ventrículo izquierdo con el área de riesgo en cada grupo experimental y B) representación de los valores del área de riesgo	137
Figura 3.7: Representación de los intervalos VV determinados en las zonas limítrofe y lejana	140
Figura 3.8: Representación del percentil 5 determinado en las zonas limítrofe y lejana	141

Figura 3.9: Representación de la frecuencia dominante determinada en las zonas limítrofe y lejana	142
Figura 3.10: Representación de los valores del coeficiente de variación de los intervalos VV determinado en las zonas limítrofe y lejana	144
Figura 3.11: Representación de los valores del coeficiente de variación del percentil 5 determinado en las zonas limítrofe y lejana	145
Figura 3.12: Representación de los valores del coeficiente de variación de la frecuencia dominante determinado en las zonas limítrofe y lejana . . .	146
Figura 3.13: Representación de los valores de la concentración espectral determinada en las zonas limítrofe y lejana	147
Figura 3.14: Inducibilidad de la fibrilación ventricular mediante la aplicación del test del extraestímulo ventricular	148
Figura 3.15: Inducibilidad de la fibrilación ventricular mediante la aplicación del test del extraestímulo ventricular con un ciclo base de 250 ms o 150 ms	149
Figura 3.16: Inducibilidad de la fibrilación ventricular mediante la aplicación del test del extraestímulo ventricular con 1, 2 y 3 extraestímulos	150
Figura 3.17: Mínimo periodo refractario efectivo y funcional global determinado en los casos que se desencadenó la fibrilación ventricular y en los que no se desencadenó	151
Figura 3.18: Mínimo periodo refractario efectivo determinado en los tres grupos experimentales en los casos que se desencadenó la fibrilación ventricular y en los que no se desencadenó	152
Figura 3.19: Mínimo periodo refractario funcional determinado en los tres grupos experimentales en los casos que se desencadenó la fibrilación ventricular y en los que no se desencadenó	153
Figura 3.20: Coeficiente de variación del periodo refractario efectivo y funcional global determinado en los casos que se desencadenó la fibrilación ventricular y en los que no se desencadenó	154
Figura 3.21: Coeficiente de variación del periodo refractario efectivo determinado en los tres grupos experimentales en los casos que se desencadenó la fibrilación ventricular y en los que no se desencadenó	155

Figura 3.22: Coeficiente de variación del periodo refractario funcional determinado en los tres grupos experimentales en los casos que se desencadenó la fibrilación ventricular y en los que no se desencadenó 156

Lista de tablas

Tabla 1.1: Procesos celulares sucedidos durante el proceso fibrótico tras el infarto de miocardio	42
Tabla 2.1: Descripción de los grupos experimentales del presente trabajo	96
Tabla 2.2: Resumen del protocolo de cuidados postoperatorios realizados durante la primera semana tras la cirugía.	104
Tabla 3.1: Valores del diámetro de la raíz aórtica y del diámetro auricular izquierdo	135
Tabla 3.2: Valores del periodo refractario efectivo determinado con los ciclos de estimulación 250 ms y 150 ms	138
Tabla 3.3: Valores del periodo refractario funcional determinado con los ciclos de estimulación 250 ms y 150 ms	139
Tabla 3.4: Coeficiente de variación del periodo refractario efectivo y funcional	143
Tabla 3.5: Regresión lineal para el análisis de la correlación de la inducibilidad de FV con los parámetros estudiados	157
Tabla 3.6: Resultados del análisis multivariado	158

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Objetivos.

El objetivo general de la presente tesis es investigar los posibles efectos beneficiosos a nivel miocárdico, de la inhibición de las desacetilasas de histonas, implicadas en los procesos de fibrosis, tras el daño miocárdico por isquemia/reperfusión, siendo los objetivos específicos:

- a) La puesta a punto de un modelo experimental crónico de infarto agudo de miocardio en conejos para investigar las alteraciones de determinadas propiedades electrofisiológicas miocárdicas, así como la inducibilidad de la fibrilación ventricular y su posible modificación por efecto de la inhibición de las enzimas desacetilasas de histonas.

- b) Analizar las características del daño miocárdico producido e investigar la posible relación existente entre los cambios morfológicos, funcionales, electrofisiológicos, y la inducibilidad de la fibrilación ventricular.

1. Introducción

1.2. Justificación de los objetivos (antecedentes)

1.2.1 El infarto de miocardio.

1.2.1.1 Introducción.

Las enfermedades cardiovasculares, especialmente la cardiopatía isquémica, son la principal causa de muerte en la actualidad (Santos *et al.*, 2019; Lopez y Adair, 2019; Timmis *et al.*, 2020) y se consideran un problema de salud pública debido a su alta incidencia y prevalencia (Wilkins *et al.*, 2017). Las proyecciones globales a medio plazo continúan considerando a la cardiopatía isquémica como la más frecuente (Alcalá *et al.*, 2017; Foreman *et al.*, 2018). Dégano *et al.* publicaron en 2013 que en España la enfermedad coronaria llevaba siendo la principal causa individual de muerte durante más de 30 años. En concreto el síndrome coronario agudo era una de las principales causas de mortalidad, morbilidad y coste sanitario. En esta publicación se concluía que el número de casos de síndrome coronario agudo iba a aumentar en las siguientes décadas, entre otras razones por la longevidad de la población. Además, la muerte súbita cardíaca por síndrome coronario agudo continúa siendo un problema de salud pública sin resolver (Dégano *et al.*, 2013; Huikuri y Junttila, 2020). De hecho, la muerte súbita cardíaca es la principal causa de muerte en Estados Unidos y supera a la mortalidad causada por los diferentes tipos de cáncer (Jazayeri y Emert, 2019). La figura 1.1 muestra las diferentes causas de muerte para todas las edades en los países miembros de la Sociedad Europea de Cardiología, en el año 2019. En ésta se observa que el porcentaje de muertes por enfermedad isquémica, tanto en mujeres como en hombres, es mayor en comparación con el resto de las muertes por enfermedad cardiovascular (Timmis *et al.*, 2019).

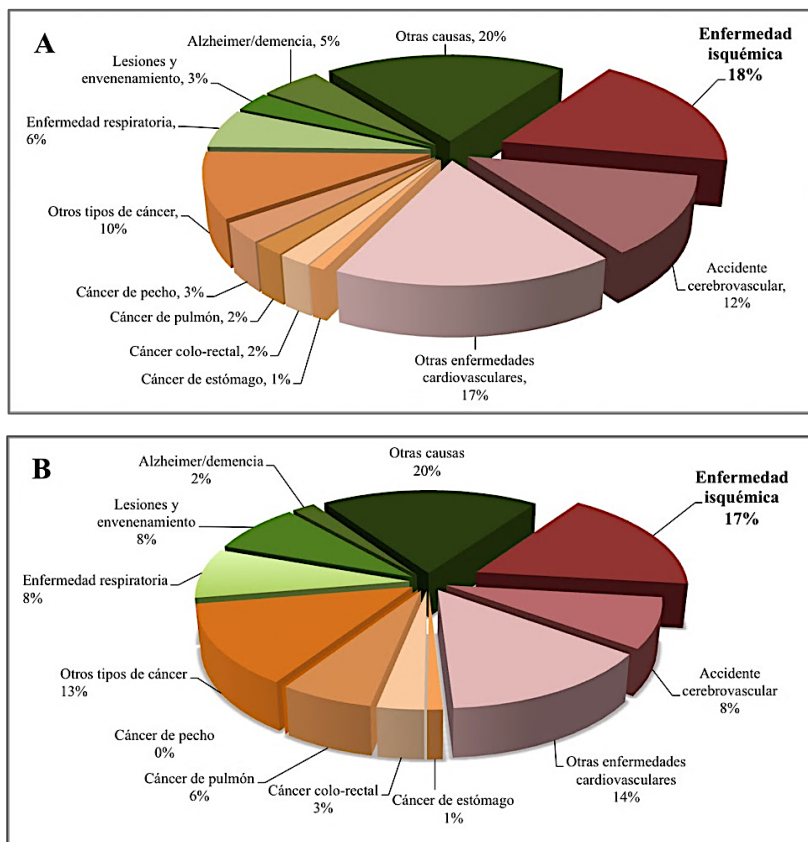


Figura 1.1 Representación de las diferentes causas de muerte para todas las edades en mujeres y hombres (A y B respectivamente) en el año 2019, en los países miembros a la Sociedad Europea de Cardiología. Los datos han sido tomados de Timmis *et al.* (2019).

La cardiopatía isquémica es una enfermedad cardíaca producida como consecuencia de alteraciones fisiopatológicas secundarias a un desequilibrio entre la demanda y el aporte de oxígeno, así como de nutrientes, en las células miocárdicas. Dicho desequilibrio habitualmente es causado por la disminución del calibre de las arterias coronarias. Este fenómeno es conocido como isquemia. La causa más frecuente de cardiopatía isquémica es la enfermedad aterosclerótica de las arterias coronarias epicárdicas. La cardiopatía isquémica puede presentarse como síndrome coronario crónico o agudo. La forma clínica del síndrome

1. Introducción

coronario crónico es la angina de pecho estable, la cual se caracteriza por la presencia en los vasos coronarios de placas de ateroma de tamaño suficiente para producir una estenosis significativa de su luz. La angina de pecho se considera estable cuando el tamaño de dichas placas permanece estable o experimenta un crecimiento lento. La estenosis coronaria es capaz de producir isquemia miocárdica ante situaciones que requieren un aumento del consumo de oxígeno del miocardio (Alcalá *et al.*, 2017; Sanchís *et al.*, 2007-A).

En cuanto al síndrome coronario agudo, este es consecuencia de la isquemia miocárdica aguda. Las placas de ateroma presentes en las arterias coronarias pueden sufrir complicaciones, como lo es su rotura. Cuando la placa se rompe se produce la exposición a sustancias que favorecen la activación y agregación plaquetaria, formándose finalmente un trombo. Dicho trombo puede ocluir parcial o totalmente el vaso sanguíneo de forma aguda produciendo el desequilibrio entre el suministro y la demanda de oxígeno. Si este desequilibrio es suficientemente intenso y persistente, finalmente surge la necrosis miocárdica (Scirica y Morrow, 2016).

Clínicamente existen dos formas de presentación de dicho síndrome: la angina inestable y el infarto agudo de miocardio (figura 1.2). En la primera, la estenosis arterial coronaria no es totalmente oclusiva con lo que no se manifiesta el proceso necrótico, siendo normales los marcadores bioquímicos. En cambio, en el segundo caso la arteria coronaria se ocluye con la consiguiente evolución hacia la necrosis y la aparición de los correspondientes marcadores (Sanchís *et al.*, 2007-B).

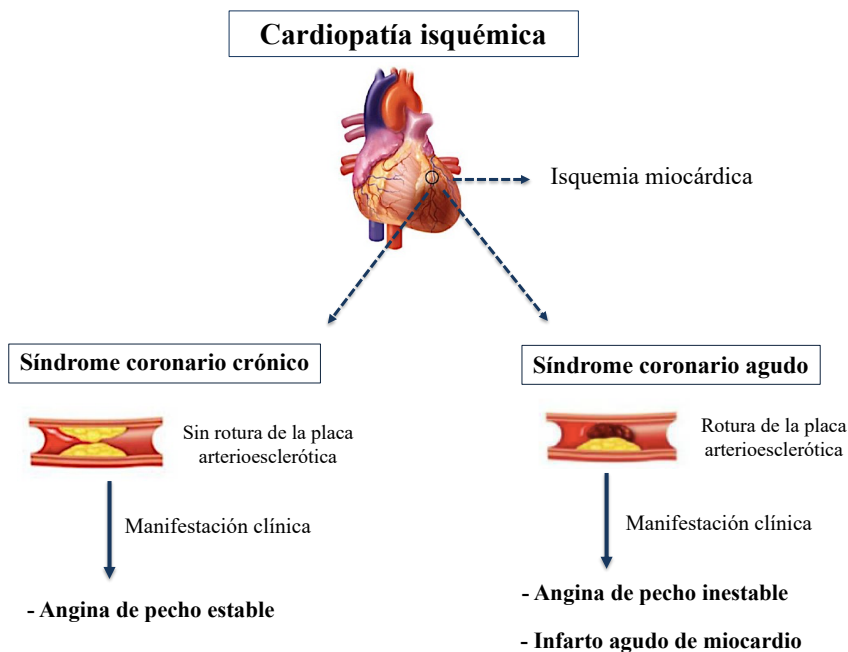


Figura 1.2 Esquema de las diferentes formas de presentación de la cardiopatía isquémica y sus manifestaciones clínicas correspondientes. Imágenes tomadas de Scirica y Morrow (2016).

Clásicamente el infarto de miocardio se ha definido como “la destrucción celular, necrosis o muerte de una zona que por déficit de riego coronario y un consumo de oxígeno importante pasa por una etapa de isquemia que se agrava” (Shapiro, 1979). Actualmente el término de infarto de miocardio se define clínicamente como “la presencia de daño miocárdico agudo detectado por la elevación de biomarcadores cardiacos en el contexto de evidencia de isquemia miocárdica aguda. Desde un punto de vista patológico, el infarto de miocardio se define por la aparición de muerte celular miocárdica secundaria a una isquemia prolongada” (Thygesen *et al.*, 2019).

1. Introducción

Es sabido que la isquemia aguda y sus consecuencias están estrechamente ligadas a la aparición de muerte súbita cardiaca (Huikuri y Junttila, 2020). En el daño miocárdico por isquemia/reperfusión intervienen una serie de procesos que contribuyen al desarrollo de disfunción ventricular, con la subsiguiente aparición de insuficiencia cardiaca y de arritmias ventriculares, responsables de gran parte de los episodios de muerte súbita cardiaca en estos pacientes. Esto se debe en parte a las características de la cicatriz que se genera en el infarto crónico y a la asociación de esta con la disfunción del ventrículo izquierdo (Bayés de Luna y Elosua, 2012).

A lo largo de los años se han producido grandes avances en el diagnóstico y en el tratamiento del infarto de miocardio. A pesar de ello, continúa siendo un importante problema de salud pública en el mundo industrializado, además de ir en aumento en los países en desarrollo. Por tanto, es esencial seguir investigando nuevas estrategias terapéuticas que faciliten la recuperación del tejido miocárdico dañado tras un proceso de isquemia y reperfusión.

1.2.1.2 Fisiopatología de la isquemia miocárdica. Evolución hacia el infarto

1.2.1.2.1. Alteraciones que acontecen en el miocardio isquémico

Los episodios de síndrome coronario agudo, como se ha comentado anteriormente, se desencadenan por alteraciones agudas debidas a la implicación de las placas ateromatosas presentes en las arterias coronarias. Estas alteraciones que consisten en disfunción endotelial, agregación plaquetaria y espasmo, conduciendo a la erosión, rotura, hemorragia y trombosis de la placa, ocurren particularmente en los fibroateromas de capa fina, considerados placas vulnerables (Buja, 2013). Por tanto, como

consecuencia acaba produciéndose una trombosis coronaria, episodio crítico que da lugar al infarto de miocardio. Cuando el trombo intracoronario resultante produce una obstrucción total de la arteria, se inician una serie de eventos metabólicos y celulares, detallados a continuación, que conllevan al inicio de la necrosis de la región del corazón irrigada por dicha coronaria ocluida. Tras la trombosis coronaria, además de las zonas miocárdicas infartadas, parte de las zonas adyacentes experimentan cambios progresivos en el transcurso de horas, días o semanas (Aaronson *et al.*, 2001).

Dichos cambios determinan la evolución desde la isquemia hacia la necrosis final, o bien pueden revertirse hacia la recuperación. Así pues, la oclusión coronaria da lugar al fenómeno de isquemia. Éste consiste en la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo que conlleva al cese del aporte de oxígeno, dando lugar a un desequilibrio entre la demanda y la oferta de oxígeno y de otros nutrientes en el músculo cardíaco, así como a una dificultad en la eliminación de productos de desecho del metabolismo cardíaco. Este sufrimiento celular, se manifiesta con el fracaso de la contracción y el deterioro del comportamiento eléctrico, y puede ocasionar la muerte del tejido afectado si resulta de suficiente intensidad (Opie, 2004 citado por Soler, 2018).

Existe una estrecha conexión entre la contracción del miocardio, el flujo coronario y el aporte de oxígeno (Canty y Duncker, 2016). El miocardio posee un metabolismo casi exclusivamente aeróbico puesto que los cardiomiocitos, a diferencia de otros tejidos y músculos, disponen de limitadas reservas de glucógeno. Por tanto, es esencial el equilibrio entre el consumo y el suministro de oxígeno del miocardio para poder desarrollar la función ventricular normal.

1. Introducción

En el corazón, los ácidos grasos son la principal fuente de energía, los cuales se metabolizan en la ruta metabólica de la beta oxidación que tras originar acetil coenzima A seguirá su proceso de degradación a través del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria, acoplada al mismo. Por tanto, una interrupción brusca de la perfusión regional tras una oclusión coronaria trombótica hace que el íntimo acoplamiento entre el aporte de oxígeno al corazón y el flujo sanguíneo coronario se vea alterado, con lo que no se dispone de oxígeno para unirse al hidrógeno y al electrón transportado por los sustratos de la cadena de transferencia de electrones conduciendo al cese de la fosforilación oxidativa. A partir de aquí hay una transición de la respiración aeróbica a la anaeróbica (Bopassa, 2012). En tales circunstancias los cardiomiocitos utilizan rutas alternativas para la generación de ATP. A medida que los suministros de fosfatos de alta energía se van agotando rápidamente, la glucólisis anaeróbica se convierte en la principal fuente de ATP, resultando en una rápida acumulación de lactato en el miocardio isquémico. En ausencia de perfusión el principal sustrato para la glucólisis es el glucógeno intracelular. No obstante, la glucólisis anaeróbica no puede reemplazar la capacidad de la fosforilación oxidativa. Durante el metabolismo anaerobio sólo se obtienen 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, en lugar de las 38 obtenidas en condiciones aerobias (Moreu-Burgos y Macaya-Miguel, 2007).

En el miocardio isquémico se acumula lactato y otros productos metabólicos provocando que, progresivamente se vaya desarrollando la acidosis intracelular que inhibe muchas de las enzimas de la vía glucolítica. Transcurridos de 15 a 20 minutos de isquemia, se produce una disminución notable de la tasa de glucólisis anaeróbica. Ésta acaba deteniéndose a pesar de la presencia de reservas de glucógeno en los cardiomiocitos (Frangogiannis, 2015). El ATP consumido acaba formando AMP, tras generar ADP. Dado que, la producción de energía a través de la

fosforilación oxidativa se halla interrumpida, el AMP formará las bases nitrogenadas inosina e hipoxantina. El decremento en las concentraciones de ATP altera la constancia fisicoquímica del entorno celular. Por tanto, durante la isquemia se produce el cese del metabolismo aerobio y el agotamiento de fosfágenos.

Las consecuencias metabólicas que tiene la isquemia sobre el miocardio suponen una grave perturbación en el equilibrio iónico de la célula que origina importantes consecuencias electrofisiológicas, aumentando la vulnerabilidad del corazón a sufrir arritmias ventriculares y como consecuencia, originar muerte súbita.

Durante el periodo de isquemia, el pH intracelular disminuye en función de la formación de protones durante la hidrólisis de ATP, y de la acumulación de estos durante la producción de ácido láctico. De la misma manera el pH extracelular disminuye a medida que los protones intracelulares pasan al compartimento extracelular por el intercambiador Na^+/H^+ , el cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, el transporte de lactato y la difusión de ácido láctico y CO_2 (Cascio, 2001). A nivel intracelular se producen cambios ultraestructurales como el agotamiento de los gránulos de glucógeno citoplasmático, la distorsión del sistema tubular transverso y la hinchazón mitocondrial. También se produce la acumulación de iones de sodio, calcio, hidrogeniones, ácido láctico y productos del metabolismo lipídico originando estos últimos la acidosis tisular (Turer y Hill, 2010); dicha acidosis inhibe la mayoría de los canales iónicos dando lugar a la caída del potencial de reposo, la prolongación de la duración del potencial de acción y la aparición de post-despolarizaciones tempranas (Frangogiannis, 2015).

A nivel extracelular, durante los primeros minutos de la isquemia se produce un aumento de la concentración extracelular de potasio $[\text{K}^+]_e$.

1. Introducción

Dicho aumento sucede en tres fases: en primer lugar, durante los primeros 20 segundos tras la oclusión coronaria se produce una rápida acumulación extracelular de potasio. Ésta es seguida por una fase de meseta (3-10 minutos) y finalmente por una fase de incremento lento (de 15-30 minutos), que parece ser coincidente con el agotamiento del ATP, marcando el periodo de daño celular irreversible (Carmeliet, 1999; Rodríguez-Sinovas y Cinca, 1999). El aumento de la concentración extracelular de K^+ en la isquemia, se da, en parte, porque la caída de los niveles de ATP da lugar a la apertura de los canales KATP por los cuales se produce la mencionada salida del ion al espacio extracelular (para revisión ver Klabunde, 2017).

Como señala Billman (2008) en una revisión relacionada con las consideraciones anteriores, las arritmias cardiacas pueden manifestarse en la generación o en la conducción de los impulsos eléctricos. Como se ha comentado en líneas anteriores, la isquemia miocárdica da lugar a una acumulación de potasio en el espacio extracelular, la cual puede provocar dichas perturbaciones en la actividad eléctrica cardiaca. El aumento en la concentración extracelular de potasio promueve la despolarización del tejido que rodea a las regiones isquémicas. Se genera un flujo de corriente electrotonica entre las células isquémicas y las normales, denominada corriente de lesión. Dicha corriente se implica como causa potencial para el inicio de latidos ventriculares prematuros. Es sabido que, en condiciones normales, las células ventriculares no muestran activación espontánea, sin embargo, sí que se puede producir una activación automática cuando las células se encuentran parcialmente despolarizadas. Coronel *et al.* (1991 y 1995) demostraron un aumento en la excitabilidad del tejido normal cerca del borde de la región isquémica, siendo una región del corazón en la que también se vieron aumentadas las concentraciones de potasio extracelular. Dichas alteraciones en el flujo de salida de potasio pueden producir cambios en la duración del potencial de acción que a su vez pueden provocar

anormalidades en la conducción del impulso. Esta salida de potasio en la región isquémica desencadena una reducción en la duración del potencial de acción (Billman, 2008).

La falta de ATP también hace que se reduzca la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa contribuyendo así a la acumulación de K^+ extracelular y a la despolarización. Precisamente, la disminución de la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa provoca un aumento de sodio intracelular (Bopassa, 2012). Este aumento de la concentración intracelular de sodio conllevará, secundariamente, a un aumento de la concentración de calcio a través de la activación del intercambiador sodio-calcio en su forma reversa. Además, durante la isquemia se inactivan los canales rápidos de Na^+ dependientes de voltaje de modo que, bajo condiciones isquémicas, la despolarización se produce de forma más lenta. Así nos encontramos ante una menor cantidad de canales de Na^+ para generar el potencial de acción y ante una pendiente de despolarización de menor amplitud y duración (Klabunde, 2017). La despolarización de la membrana, el acortamiento de la duración del potencial de acción y las alteraciones de la repolarización facilitan la aparición de post-despolarizaciones tempranas y tardías que finalmente desencadenarán arritmias. En la sobrecarga de calcio intracelular también interviene la inhibición del sistema de transporte activo de calcio (Opie, 2004 citado por Soler, 2018).

La caída de la energía libre procedente de la hidrólisis de ATP, así como las alteraciones iónicas que hemos visto a nivel tanto intracelular como extracelular, afectan de manera directa la función de los receptores del sarcolema, canales iónicos, transportadores y al potencial de membrana (Cascio, 2001). Todas estas alteraciones se distribuyen de manera heterogénea dentro del área isquémica. Esta heterogeneidad favorece la aparición de un ambiente arritmogénico en el miocardio isquémico que facilita la aparición de arritmias, entre otras, por mecanismos de reentrada

1. Introducción

(Rodríguez-Sinovas y Cinca, 1999). La acumulación de potasio en el exterior celular se produce de manera heterogénea entre la zona isquémica, la zona perfundida de manera normal y la llamada zona limítrofe o adyacente que se encuentra entre ambas. Esto conlleva a heterogeneidades en el potencial de membrana en reposo, la duración del potencial de acción, la refractariedad y la excitabilidad, que pueden originar obstáculos funcionales y bloqueos unidireccionales y que junto con la propagación no uniforme del potencial de acción por zonas en las que se dan velocidades de conducción variables, facilita las activaciones reentrantes que, como es sabido intervienen en el desarrollo de la fibrilación ventricular en la fase isquémica aguda (Hundahl *et al.*, 2017).

En relación con las alteraciones mecánicas que se producen en el miocardio isquémico hay que señalar que, tras los primeros 30-45 segundos de interrupción del flujo sanguíneo miocárdico, aparece una disfunción diastólica y sistólica al tiempo que aparecen cambios electrocardiográficos. Dicha interrupción del flujo sanguíneo da lugar a cuatro patrones anormales de contracción sistólica que suceden secuencialmente. Primero hay una disociación temporal de la contracción de los segmentos miocárdicos adyacentes; posteriormente se da una hipocinesia (disminución del acortamiento miocárdico) para ir progresando hacia una acinesia, y finalmente se produce una expansión de los segmentos miocárdicos afectados que se denomina discinesia (Alpert, 1989). Tanto el gasto cardiaco en reposo como el volumen de expulsión sistólico se reducen cuando hay una importante cuantía de miocardio isquémico, ya que los segmentos miocárdicos afectados contribuyen a la reducción del gasto ventricular (Alpert, 1989). La “adaptación” más importante a la isquemia es una abrupta disminución en el consumo de oxígeno en la medida en que la fuerza de contracción disminuye rápidamente; esto forma parte de la llamada cascada isquémica que implica también a la función diastólica que

asimismo se ve alterada (Opie, 2004). Además, la recuperación de la función miocárdica sistólica y diastólica es inversamente proporcional a la duración de la isquemia miocárdica (Alpert, 1989).

1.2.1.2.2. Infarto de miocardio. La transición de la isquemia a la necrosis

En relación con los cambios morfofuncionales, en el infarto experimental se ha visto que, cuando el periodo de isquemia es de 20 minutos aproximadamente, el músculo cardiaco comienza a sufrir los primeros cambios ultraestructurales: reducción del tamaño y número de gránulos de glucógeno, edema intracelular y tumefacción con distorsión del sistema tubular transverso, retículo sarcoplásmico y mitocondrias (Scirica y Morrow, 2016). Estas alteraciones, así como las anteriormente citadas a nivel mecánico, son completamente reversibles tras la restauración del flujo coronario, que permite la supervivencia de los cardiomiocitos afectados. Sin embargo, cuando la duración de la oclusión coronaria es superior a 20-30 minutos se considera un periodo de tiempo suficiente para inducir cambios irreversibles en algunos cardiomiocitos del área subendocárdica (Frangogiannis, 2015). De hecho, transcurridos 60 minutos de oclusión coronaria, los cambios que se observan consisten en tumefacción y alteración interna de las mitocondrias y agregación floculante, marginación de la cromatina nuclear, así como relajación de las miofibrillas. Por tanto, entre los 20 y 60 minutos, se puede producir una progresión de las alteraciones anteriormente citadas, dando lugar a que los cambios que sufren los cardiomiocitos afectados lleguen a ser irreversibles (Scirica y Morrow, 2016). En la figura 1.3 se representa la progresión del daño miocárdico en función de la duración del periodo de isquemia.

1. Introducción

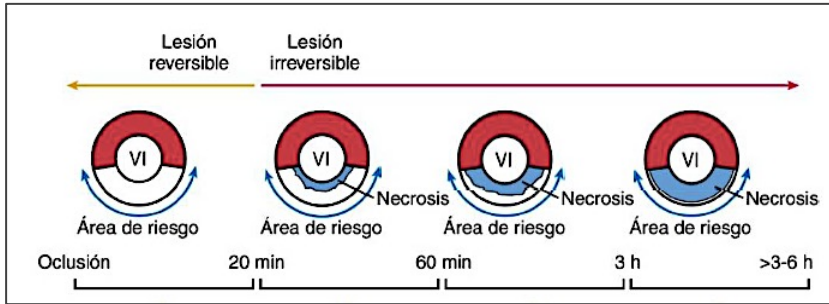


Figura 1.3 Progresión del daño miocárdico en función a la duración de la oclusión coronaria (VI: ventrículo izquierdo). Figura tomada de Canty y Duncker (2016).

Los cardiomiocitos comienzan a morir rápidamente debido a un gran número de factores: hipoxia y agotamiento de energía en ausencia de reserva aeróbica (desequilibrio entre el aporte y el consumo de oxígeno), acidosis, estrés oxidativo y estimulación de citoquinas, dando lugar a un incremento exponencial de la muerte celular. Si no se consigue la reperusión de la zona isquémica en 6 horas desde el inicio de la oclusión coronaria, casi todo el miocardio no perfundido se ve afectado por la necrosis (Tibaut *et al.*, 2016). El patrón de necrosis que se produce en el miocardio afectado es conocido como “frente de onda de necrosis”; la necrosis afecta en primer lugar a la región subendocárdica del área de riesgo, y desde esta zona progresa gradualmente hacia la región subepicárdica (Reimer *et al.* 1977). No está bien definido por qué la necrosis se inicia en la región subendocárdica y progresa hasta el epicardio. Se piensa que, cuando la presión de perfusión disminuye debido a una lesión coronaria, el flujo sanguíneo subendocárdico se ve más comprometido en comparación con el suministro sanguíneo subepicárdico. Esto es debido a una mayor resistencia de los vasos subendocárdicos, o a un flujo de retorno sistólico desde los vasos endocárdicos a los epicárdicos (Frangogiannis, 2015).

Algranati *et al.*, realizaron un estudio en 2011 sobre la vulnerabilidad del subendocardio a la isquemia mediante una modelización de la microcirculación coronaria. En dicho modelo sugieren que el incremento de la vulnerabilidad del subendocardio a una reducción aguda en la presión de perfusión puede deberse principalmente a desigualdades en la complianza vascular inducidas por diferencias transmurales tanto en la carga extravascular como en el grosor de la pared del vaso (Algranati *et al.*, 2011).

Dicho patrón de necrosis da lugar a diferencias entre las regiones centrales del infarto y las periféricas. La zona central está compuesta por cardiomiocitos necróticos con miofibrillas relajadas. Mientras que, las zonas periféricas o limítrofes presentan cardiomiocitos necróticos con bandas de contracción y depósitos de calcio. La zona lejana del infarto muestra características de lesión de menor gravedad. Estos patrones morfológicos reflejan que la lesión evoluciona en base a un gradiente de déficit de perfusión, desde el centro hasta la periferia de la zona isquémica (Buja, 2005).

Cuando la necrosis miocárdica afecta a todo (o casi todo) el grosor de la pared ventricular se denomina infarto transmural. Si la necrosis, por el contrario, sólo afecta al subendocardio, al miocardio intramural o a ambos, pero sin extenderse a todo el espesor de la pared ventricular hasta llegar al epicardio, se habla de infarto subendocárdico no transmural (Scirica y Morrow, 2016). La extensión final del infarto va a depender principalmente de dos factores: 1) la duración de la oclusión coronaria, ya que cuanto más tiempo se prolongue la misma, mayor es el avance del frente de necrosis y por tanto la extensión del infarto; 2) la existencia o el desarrollo de una buena red de circulación colateral, la cual aportaría flujo sanguíneo a la zona de riesgo y por tanto disminuiría el tamaño final del infarto (Sanchís *et al.*, 2007-C). En la figura 1.4 se observa el grado de

1. Introducción

transmuralidad de un infarto de miocardio en función de la duración de la oclusión coronaria.

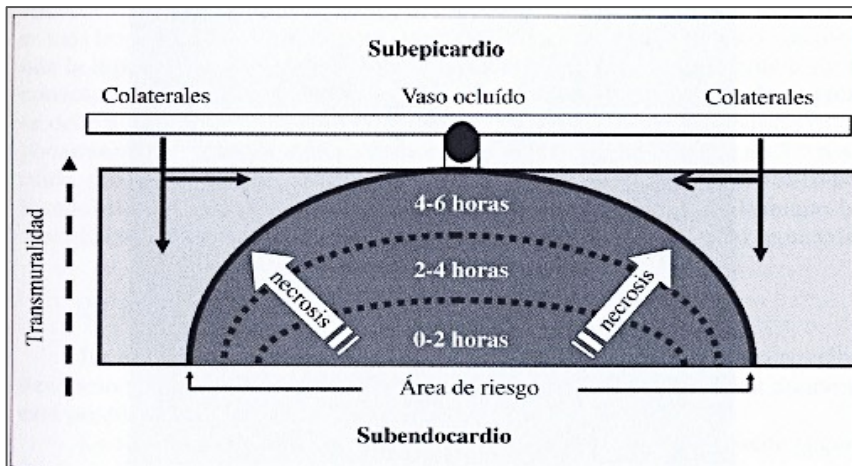


Figura 1.4 Progresión del daño miocárdico desde el subendocardio hasta el subepicardio en función de la duración de la oclusión coronaria, mostrando así el grado de transmuralidad. Figura tomada de Sanchís *et al.* (2007-C).

1.2.1.2.3. Mecanismos que promueven la muerte de los cardiomiocitos

En relación con los mecanismos que promueven la muerte celular en el infarto, gran número de investigaciones han proporcionado una importante información al respecto (para revisión ver cita de Frangiogiannis, 2015) y que se resumen a continuación. Tras la oclusión coronaria se implican los dos mecanismos principales de muerte celular: apoptosis y necrosis. Se ha visto que, tanto en modelos experimentales de oclusión permanente como en modelos de infarto de miocardio con isquemia y reperfusión, durante las primeras 6-24 horas, se produce una gran oleada de muerte de los cardiomiocitos presentes en la zona infartada. Posteriormente se produce una segunda oleada, de menor intensidad, debida a la activación de rutas de señalización proinflamatorias en la región infartada y al estrés biomecánico sufrido. En la zona adyacente al infarto o

zona periinfarto, también se acaba produciendo, aunque en menor cuantía, muerte celular, que continúa durante meses en el miocardio lejano a medida que avanza la remodelación del tejido infartado (Konstantinidis *et al.*, 2012). En modelos experimentales se ha observado que, ocasionalmente, los cardiomiocitos presentes en segmentos de remodelación viables pueden llegar a sufrir apoptosis semanas o meses tras el infarto agudo de miocardio. Se desconoce el grado de contribución de este proceso en la progresión de la disfunción ventricular.

Clásicamente se pensaba que durante el infarto de miocardio los cardiomiocitos de la zona isquémica morían principalmente por necrosis. Ésta consiste en un proceso pasivo y no regulado, que se caracteriza por hinchazón celular y mitocondrial, vacuolización citoplasmática e hinchazón del núcleo y del citoplasma (oncosis) debido al fallo energético provocado por la oclusión coronaria. Además, se produce una pérdida de la integridad de la membrana plasmática que conduce a la liberación de moléculas celulares tóxicas que pueden desencadenar una intensa reacción inflamatoria, incrementando así ambos procesos, la destrucción de las células afectadas y el daño colateral que sufren las células adyacentes (Forteza *et al.*, 2014; Kalogeris *et al.*, 2017). Dicha reacción inflamatoria desencadenada por el infarto agudo de miocardio sugiere una abundancia de cardiomiocitos necróticos.

Se diferencian dos tipos de patrones de necrosis miocárdica en función del daño por isquemia y reperfusión sufridos en el miocardio. En primer lugar, cuando se da un proceso de isquemia marcada y persistente se produce una necrosis por coagulación o necrosis coagulativa. En estos casos es común que la necrosis aparezca en la región central del infarto y provoque la detención de las células musculares en estado relajado, así como una distensión pasiva de las células musculares isquémicas. En el tejido afectado se observan miofibrillas distendidas, gran cantidad de

1. Introducción

células con núcleos picnóticos, microvasos congestionados y fagocitosis de las células musculares necróticas. Además, se producen daños mitocondriales con formación de densidades amorfas (floculentas) prominentes, pero no se observa calcificación (Scirica y Morrow, 2016).

Cuando la isquemia va seguida de reperfusión, se produce una necrosis con bandas de contracción o miocitólisis coagulativa. Este tipo de necrosis se caracteriza por la presencia de miofibrillas hipercontraídas con bandas de contracción y daño mitocondrial, normalmente con calcificación, congestión vascular marcada y cicatrización mediante lisis de las células musculares. Es causada por un incremento en el flujo de entrada de calcio en células que se hallan próximas a la muerte, produciendo la parálisis de las células en estado de contracción. Este tipo de necrosis se observa en la periferia de infartos de gran tamaño, siendo mayor en aquellos infartos que no son transmurales en comparación con los transmurales. Es posible que esta forma de necrosis esté presente en todo el infarto tras la reperfusión (Scirica y Morrow, 2016).

En la actualidad se sabe que las células sometidas a un daño por isquemia y reperfusión también mueren de manera programada a través de procesos como la apoptosis. Ésta consiste en un proceso celular programado, que se caracteriza morfológicamente por condensación, marginación y degradación de la cromatina, alteración del citoesqueleto, contracción celular, formación de ampollas en la membrana y finalmente fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos cerrados por la membrana. Estos últimos son eliminados rápidamente por fagocitos especializados, evitando así la inducción de reacción inflamatoria (Bialik *et al.*, 1997). La muerte celular apoptótica se produce por mecanismos de señalización específicos que pueden ocurrir a través de las vías extrínseca (mediante la unión de ligandos a receptores de muerte en la superficie celular) e intrínseca (mediante señalización mitocondrial). Entre ambas vías

existen múltiples enlaces bioquímicos y funcionales. La isquemia miocárdica es capaz de inducir disfunción mitocondrial, la cual está implicada tanto en la necrosis como en la apoptosis de los cardiomiocitos del miocardio infartado (Kalogeris *et al.*, 2017). Sin embargo, actualmente no está claro el grado de contribución de cada uno de los procesos de muerte celular anteriormente citados durante el infarto de miocardio.

Un mecanismo importante es el de la autofagia. Éste es un proceso metabólico vital encargado de la degradación, por los lisosomas, de las proteínas y orgánulos senescentes o dañados en aminoácidos y ácidos grasos para la producción y reciclaje de energía. Este mecanismo se activa en respuesta a la falta de nutrientes o al estrés metabólico que sufren las células, como ocurre durante el periodo de isquemia. La autofagia por tanto se comporta como respuesta adaptativa, contribuyendo a la preservación morfofuncional de la célula (Wu *et al.*, 2019). El papel de la autofagia en la muerte celular inducida por la isquemia y las consecuencias funcionales de la misma es complejo. De hecho, se ha sugerido que dicho proceso posee un papel protector y al mismo tiempo efectos lesivos (Gustafsson *et al.*, 2008 y Lavandero *et al.*, 2013 citados por Frangogiannis, 2015). Si el periodo de isquemia se prolonga, el grado de degradación autofágica de aquellos componentes celulares críticos empieza a contribuir al daño postisquémico, considerándose por tanto una modalidad de muerte en el proceso de isquemia y también, como se detallará más adelante, en el de la reperfusión (Kalogeris *et al.*, 2017).

1.2.1.3 Modificaciones por la reperfusión

Recuperar la perfusión del tejido miocardio isquémico es la principal estrategia terapéutica para evitar el deterioro progresivamente mayor del miocardio privado de irrigación sanguínea. Esta medida debe llevarse a cabo de la forma más rápida posible con el fin de minimizar la formación

1. Introducción

de un tejido irreversiblemente dañado que, como se ha comentado en líneas anteriores, acaba siendo una cicatriz fibrosa inoperante, funcionalmente hablando.

La restitución de la perfusión perdida se puede conseguir mediante intervenciones como son la lisis del trombo intracoronario tras la administración de sustancias fibrinolíticas, la realización de una angioplastia percutánea con dilatación y e implante de un *stent* o incluso mediante la realización de un *bypass* aortocoronario. Pese a que la reperusión es una maniobra que puede operar favorablemente sobre lo que se denomina miocardio en riesgo (el irrigado por la arteria coronaria ocluida), no está exenta de efectos indeseables a los que en conjunto se les llama “lesión por referfusión”.

Reimer *et al.* (1977) en una publicación ya clásica expusieron que los efectos de la reperusión miocárdica eran la preservación de los cardiomiocitos reversiblemente dañados allá donde se podía realizar la restitución del flujo, pero las células irreversiblemente dañadas sufrían un proceso de disrupción rápida con activación de fenómenos inflamatorios, y de mecanismos de reparación. Como consecuencia del daño vascular, que, no obstante, no impedía el flujo de sangre, se producía una hemorragia intersticial, y finalmente no se modificaba la evolución de las células de zonas no perfundidas.

De manera resumida se puede decir que los factores implicados en los efectos deletéreos de la reperusión (Bonanad *et al.*, 2013; García-Dorado *et al.*, 2014; Hervas *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2018; Barzyc *et al.*, 2020) van desde la activación del sistema de complemento y del sistema plaquetario, pasando por la formación de tapones de leucocitos agregados (responsables del fenómeno del “no reflujo”), la obstrucción microvascular, la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno y de otras

moléculas, la formación de bandas de contracción anómala, mediada por calcio, por parte de los cardiomiocitos, y la alteración de la función mitocondrial que lleva al desencadenamiento de la apoptosis, además de otros procesos que se derivan de la activación de proteasas citosólicas y de fosfolipasas de la membrana celular que, transformando la lecitina en lisolecitina, desestructuran la membrana y facilitan la arritmogénesis.

En relación con la viabilidad del miocardio en función del tiempo transcurrido desde la oclusión coronaria hasta la restitución del flujo, a continuación, se exponen las siguientes observaciones que retrotraen a los primeros trabajos experimentales realizados al respecto ya hace más de cinco décadas. Cuando la reperfusión se realiza con posterioridad a entre 20 y 40 minutos de la oclusión coronaria, aunque se inicia una necrosis subendocárdica, permite mantener viable gran parte del miocardio subepicárdico (Jennings *et al.*, 1960; Reimer *et al.*, 1973, citados por Reimer *et al.*, 1977). Periodos más cortos de isquemia, como 15 minutos seguidos de reperfusión, permiten hacer reversible el proceso y restituir la normalidad; mientras que con periodos ligeramente superiores (20 minutos) se puede iniciar el proceso necrótico (Jennings *et al.*, 1960). Los cardiomiocitos exhiben bandas de contracción anómala y se produce hinchazón tanto celular como de las mitocondrias; mientras que en la reperfusión llevada a cabo en la fase de cambios reversibles no se producen bandas de contracción anómala y desaparecen las alteraciones ultramicroscópicas relacionadas con la lesión isquémica, tales como la hinchazón mitocondrial (Jennings *et al.*, 1985, citados por Frangogiannis, 2015).

En lo que respecta a las membranas celulares, éstas se separan de las miofibrillas con formación de ampollas subsarcolemales y entre 2 y 20 minutos de reperfusión se produce un incremento cualitativo y cuantitativo

1. Introducción

de cuerpos densos en las mitocondrias (Kloner *et al.*, 1974). Al parecer y sobre la base de alguna de las observaciones realizadas por los autores que se acaban de citar y que usaron modelos caninos, la lesión irreversible se relaciona con alteraciones en la regulación del volumen celular.

Capone y Most (citados por Higginson *et al.*, 1983) observaron la presencia de hemorragia miocárdica en cerdos a los que se les reperfundió tras una hora de oclusión arterial coronaria. En relación con la presentación de hemorragia, como se deja constancia en una revisión, ya también clásica, de Fox *et al.* (1985), la diferencia entre la simple oclusión con la oclusión seguida de reperfundición, es que la magnitud de la hemorragia es mayor en la segunda situación, aunque desde luego la magnitud de la hemorragia tras la reperfundición depende del grado de isquemia previa, ya que durante la misma se produce daño vascular y se manifiesta fisiopatológicamente de modo especial al restituir el flujo sanguíneo.

Kerber *et al.*, (1986) publicaron que la reperfundición, una hora o 2 tras la oclusión coronaria, en modelos caninos de infarto a tórax cerrado, actuó protegiendo contra las alteraciones miocárdicas que originaban una importante discinesia cuando no se reperfundió la arteria coronaria ocluida.

La oclusión arterial coronaria durante una hora seguida de reperfundición en un modelo de infarto agudo en ratones a tórax cerrado, además de reducir el tamaño del infarto respecto a la oclusión coronaria permanente, produce infiltración de leucocitos y bandas de contracción anómala (Rai *et al.*, 2017). En cuanto a la reducción del tamaño del infarto, las anteriores observaciones contrastan con las de otras importantes investigaciones. Así Boyle y Weisman (1993) llevaron a cabo una investigación con doscientos ratones a los que se les dividió en los siguientes grupos: 1. Infarto por oclusión coronaria permanente de una o

dos horas; 2. Infarto seguido de reperfusión, una o dos horas tras la oclusión; 3. Infarto con reperfusión tras 6 a 8 horas de oclusión coronaria; 4. Un grupo de falsos operados. Entre los resultados obtenidos en este amplio estudio destacaron aquellos que indicaban que la magnitud del infarto no se redujo cuando la reperfusión se realizó una o dos horas tras la oclusión coronaria. No obstante, en lo que concierne al fenómeno de la expansión del infarto, sí se limitó con la reperfusión tras el tiempo de oclusión comentado. Incluso cuando la reperfusión se realizó tras seis u ocho horas después de la oclusión también se limitó la expansión del infarto. La reperfusión “limpió” los residuos de cardiomiocitos muertos de modo más acelerado, lo que, en opinión de estos autores tendría repercusión positiva en la aceleración de la formación de la cicatriz. La reperfusión también aumentó la lisis celular, pero no cambió “el nivel de cicatrización final, la densidad tisular o las células subepicárdicas viables”.

En relación con la investigación de la presente tesis doctoral se debe mencionar que la lesión isquémica da origen a un proceso de remodelado cardíaco y a la fibrosis. La reperfusión disminuye la fibrosis en comparación con la oclusión permanente pese a que provoca una elevada infiltración de células inflamatorias y aumenta la formación de nuevos vasos en el territorio infartado (Vandervel *et al.*, 2006, citado por Rai *et al.*, 2017). En relación con esto último, la neovascularización del tejido viable en la zona limítrofe de alrededor es de gran importancia en el proceso de la remodelación (Cochain *et al.*, 2013).

Pese a que tras la restitución del flujo sanguíneo en el corazón sometido a infarto se produce un incremento e intensificación de la respuesta inflamatoria, la reperfusión ejerce protección miocárdica, tanto por la mejor respuesta reparativa como por actuar previniendo la tendencia del infarto a ser transmural (Frangogiannis, 2015).

1. Introducción

1.2.1.4 Proceso de cicatrización del tejido cardíaco dañado

El corazón de mamífero adulto posee una capacidad regenerativa muy limitada, esto hace que, cuando se produce la muerte de un gran número de cardiomiocitos debido a la oclusión coronaria, en el miocardio infartado se inicie la formación de una cicatriz, con el objetivo de eliminar el tejido lesionado y reemplazarlo por un tejido cicatricial de colágeno encargado de mantener la integridad estructural del ventrículo izquierdo y prevenir así, posteriores efectos deletéreos como la ruptura cardíaca (Frangogiannis, 2015; Humeres y Frangogiannis, 2019). Estos mecanismos de reparación van a inducir cambios tanto estructurales como funcionales, no solo en la zona infartada, sino también en aquellas zonas que no han sido sometidas a daño miocárdico. Cabe destacar que, a pesar de que el papel de algunos de estos cambios sea adaptativo y fisiológico como compensación a corto plazo por la pérdida repentina de la función contráctil en el área infartada, con el tiempo pueden llegar a ser patológicos y conducir a insuficiencia y muerte cardíaca, como se detallará más adelante (Van der Laan *et al.*, 2012).

El proceso de cicatrización está formado por tres fases secuenciales y solapadas: una primera fase activada por la muerte súbita aguda de los cardiomiocitos en la zona infartada y caracterizada por la activación de rutas de señalización de la inmunidad innata que desencadenan una reacción inflamatoria intensa pero transitoria; durante la segunda fase denominada proliferativa, se produce por un lado la supresión de la señalización proinflamatoria, y por otro, intervienen diversos tipos celulares que secretan factores de crecimiento que reclutan y activan a las células mesenquimales, predominantemente miofibroblastos y células vasculares encargadas de secretar grandes cantidades de proteínas de la matriz extracelular preservando así la integridad estructural del tejido; finalmente la fase de maduración se caracteriza por la apoptosis de la

mayoría de las células reparadoras conforme el infarto va madurando y se va formando la cicatriz compuesta por colágeno reticulado (Frangogiannis, 2014).

1.2.1.4.1. Fase inflamatoria del proceso de cicatrización

Durante los primeros días tras sufrir el infarto de miocardio empieza la fase inflamatoria del proceso de reparación del tejido cardiaco dañado. Si el periodo de isquemia es suficientemente prolongado los cardiomiocitos comienzan a morir por los procesos celulares de necrosis y apoptosis, dando lugar a una lesión en el tejido cardiaco, la cual genera señales endógenas que activan el sistema de inmunidad innata y se inicia la cascada molecular de reparación de heridas, en la que participan una variedad de células inflamatorias incluidos neutrófilos, macrófagos y linfocitos que invaden la zona isquémica a las pocas horas del inicio de la lesión (Richardson *et al.*, 2015; Forteza *et al.*, 2018). Las células necróticas y lesionadas, así como la matriz extracelular dañada liberan sustancias que actúan como “mediadores de peligro” y activan la inmunidad innata; estas sustancias son las llamadas alarminas. Estas moléculas se unen a los receptores de reconocimiento de patrones afines del sistema inmune innato en las células parenquimatosas que han sobrevivido y en los leucocitos infiltrantes para, activar una cascada de mediadores inflamatorios que incluyen citoquinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión celular, desencadenándose la respuesta inflamatoria (Prabhu y Frangogiannis, 2016). Además, las células necróticas, a parte de la liberación de las alarminas, pueden liberar otros componentes intracelulares como son los miembros de la familia S100 (como S100A8/A9), la interleuquina-1 α , proteínas de choque térmico, ATP y ARN extracelular los cuales pueden tener un papel importante como activadores de la respuesta inmune innata en el corazón infartado (Frangogiannis, 2015).

1. Introducción

Tras la lesión isquémica se ven afectadas la matriz extracelular junto con las proteínas que la forman. Estas proteínas no solo se encargan de dar soporte mecánico, sino que juegan un importante papel en la supervivencia y en la función de los cardiomiocitos. Durante la fase inflamatoria se produce la degradación y fragmentación de la matriz extracelular. Al fragmentarse el colágeno se generan señales activadoras de múltiples células que participan en la inflamación. Se degrada también el ácido hialurónico resultando en la liberación de fragmentos de bajo peso molecular que pueden transducir señales proinflamatorias (Frangogiannis, 2015). Las células inflamatorias y los cardiomiocitos necróticos secretan y activan las metaloproteinasas de la matriz (MMP) con el objetivo de iniciar la remodelación estructural del área isquémica. El papel de estas proteinasas es degradar el material celular y de la matriz extracelular, ayudando así a los macrófagos en la reabsorción de tejido necrótico. Conforme se van reabsorbiendo estos cardiomiocitos necróticos se va formando un tejido de granulación provisional formado por fibrina, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos y otra matriz en su lugar. Estas proteínas de la matriz se encargan de mantener un soporte estructural temporal hasta que posteriormente los miofibroblastos regulen la secreción de colágeno fibrilar que finalmente se convertirá en el principal componente estructural del tejido cicatricial cardíaco (Richardson *et al.*, 2015). Esta matriz provisional que se genera promueve la migración de células inflamatorias y reparadoras a la zona dañada. Además, sirve como soporte estructural para la infiltración de leucocitos y la proliferación de fibroblastos y células vasculares (Frangogiannis, 2015). Las células inflamatorias, además de producir proteínas, regulan al alza la liberación de una gran cantidad de citoquinas de señalización, factores de crecimiento y hormonas, esenciales para el reclutamiento y activación de los fibroblastos a medida que el proceso de reparación evoluciona hacia la segunda fase que es la de proliferación o fibrosis (Richardson *et al.*, 2015). Al parecer el sistema del

complemento se activaría en la zona infartada contribuyendo a la señalización inflamatoria.

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) también activa a las células del sistema inmune en el corazón infartado. Estas especies reactivas de oxígeno promueven la quimiotaxis de los leucocitos mediante la activación del complemento, mediante la estimulación de la expresión de P-selectina y regulando al alza la síntesis de citoquinas y quimiocinas a través de la activación del sistema del factor nuclear κ B. Se debe tener en cuenta que a pesar de que la generación de ROS es importante para la reparación del tejido cardíaco tras sufrir un infarto, una señalización sobreactivada de estas especies tiene efectos deletéreos ya que promueve la apoptosis celular mediante la inducción y la degradación de la matriz extracelular. Tras el infarto de miocardio se dañan las defensas antioxidantes que posee el corazón de manera fisiológica, dando lugar a una generación neta de radicales libres que pueden suprimir la función del miocardio y activar a las células inmunes dando lugar a lesiones inflamatorias (Frangogiannis, 2015).

Durante esta fase intervienen distintos tipos celulares que actúan como efectores celulares de la activación de la respuesta inflamatoria. La contribución relativa de cada uno de ellos en la activación de las cascadas inflamatorias no está del todo clara (Prabhu y Frangogiannis, 2016). Como se ha comentado anteriormente, los cardiomiocitos necróticos son el principal estímulo de activación de la reacción inflamatoria mediante la liberación de señales endógenas. Por otro lado, los cardiomiocitos que sobreviven en la zona limítrofe del infarto también pueden desencadenar la activación inflamatoria mediante la producción y secreción de citoquinas en respuesta a la activación con interleuquina-1, los ligandos TLR o especies reactivas de oxígeno (Prabhu y Frangogiannis, 2016). En el caso de los fibroblastos cardíacos residentes, en las primeras horas tras el infarto

1. Introducción

de miocardio originan la activación del inflamasoma. Estos fibroblastos activados son capaces de sintetizar grandes cantidades de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias (Frangogiannis, 2015). Las plaquetas también actúan en el miocardio infartado, ya no solo como función homeostásica, sino que también pueden modular respuestas inflamatorias y reparadoras mediante la secreción de quimiocinas y factores de crecimiento. Estas plaquetas activadas tras el daño isquémico se agregan en el sitio de la lesión contribuyendo a la formación de la matriz provisional basada en fibrina. Por otro lado, los neutrófilos infiltrantes en el infarto de miocardio, al generar especies reactivas de oxígeno y liberar enzimas proteolíticas, contribuyen a la eliminación de células muertas y de restos de la matriz (Frangogiannis, 2015).

En cuanto a los monocitos y los macrófagos también juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria. El reclutamiento de subconjuntos distintos de monocitos que poseen propiedades reparadoras puede desempeñar una función importante en la activación de fibroblastos y células endoteliales, promoviendo la formación de la cicatriz del tejido dañado. En cuanto a los macrófagos se encargan de fagocitar las células muertas y restos de matriz eliminando de la zona infartada los neutrófilos y cardiomiocitos apoptóticos. También pueden servir como fuente de citocinas y factores de crecimiento que regulan la actividad inflamatoria, el crecimiento y la activación de fibroblastos, así como la formación y maduración de nuevos vasos que ayuden a la reperfusión del tejido lesionado. Además, contribuyen a la formación de metaloproteinasas de la matriz y sus inhibidores ayudando al remodelado de la matriz extracelular (Frangogiannis, 2015). En el caso de los mastocitos, éstos están ubicados en áreas perivasculares y contienen reservas preformadas de mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF), histamina y triptasa. La estimulación de

citoquinas, adenosina, especies reactivas de oxígeno y la activación de la cascada del complemento inducen la degranulación de los mastocitos, dando lugar a la liberación del TNF y la histamina que participan en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria postinfarto (Prabhu y Frangogiannis, 2016). En la figura 1.5 se representa la respuesta inflamatoria que tiene lugar tras el infarto de miocardio, así como los distintos efectores celulares citados anteriormente y que participan en la misma.

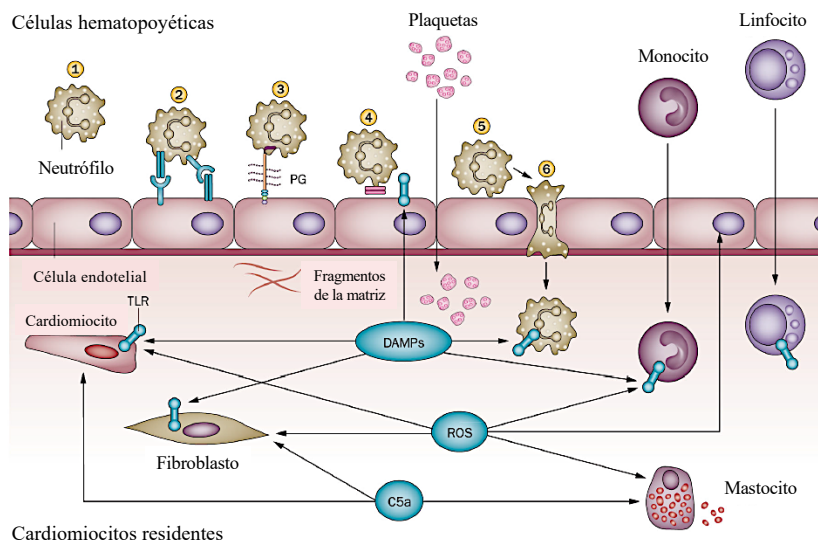


Figura 1.5 Reacción inflamatoria que tiene lugar tras el infarto de miocardio. En la imagen se observan los distintos tipos celulares que participan en el desencadenamiento de dicha respuesta inflamatoria. DAMPs: patrones moleculares asociados a peligro por sus siglas en inglés; TLR: receptores tipo Toll; ROS: especies reactivas de oxígeno; C5a: hace referencia al sistema del complemento. Figura tomada y traducida de Frangogiannis (2014).

1.2.1.4.2. Fase proliferativa del proceso de cicatrización

Para que tenga lugar la fase proliferativa del proceso de cicatrización del miocardio dañado y siga avanzando la reparación del tejido, el proceso inflamatorio iniciado tras la lesión isquémica debe ser

1. Introducción

suprimido, ya que la prolongación o la expansión de reacciones inflamatorias sobreactivadas puede dar lugar a daños y disfunción. Este proceso de represión está asociado con la activación de las células mesenquimales que depositan proteínas de la matriz, preservando la integridad estructural del miocardio infartado (Frangogiannis, 2014). En el caso de la función miocárdica, al encontrarse estrechamente ligada a la preservación de la integridad estructural, una supresión alterada o una contención defectuosa de la reacción inflamatoria puede llegar a generar efectos deletéreos. Entre dichos efectos se encuentran la pérdida de cardiomiocitos, la supresión de la función sistólica, procesos acentuados de degradación de la matriz que pueden dar lugar a una dilatación de la cámara cardíaca, un aumento de la degradación del tejido que origine la pérdida de la integridad de la pared ventricular y la ruptura cardíaca, y por último cambios fibróticos que pueden llegar a extenderse más allá de la zona inicial del infarto. Por tanto, es necesaria la regulación negativa de las vías de señalización proinflamatorias, para el mantenimiento de la homeostasis tisular y la activación de la respuesta reparadora (Frangogiannis, 2014).

Uno de los principales mecanismos celulares que interviene en la resolución y supresión de la inflamación, es la eliminación de las células muertas y los restos de la matriz del área infartada, excluyéndose así el estímulo principal para la activación inflamatoria. Cuando los fagocitos ingieren células apoptóticas liberan una gran cantidad de mediadores inhibitorios como las citoquinas antiinflamatorias, interleuquina-10 y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Éste último es un factor clave puesto que, además de disminuir la acción adhesiva de las células inflamatorias, estimula la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos (Daskalopoulos *et al.*, 2012). Por otro lado, los neutrófilos que se han infiltrado en la zona infartada se programan para sufrir apoptosis ayudando a la resolución de la inflamación (Frangogiannis, 2015). Una vez

se ha producido la limitación del proceso inflamatorio, por los mecanismos citados sucintamente, entre otros, comienza a producirse la fase proliferativa en la que participan de una manera fundamental los fibroblastos.

Los fibroblastos son células de origen mesenquimatoso que se encuentran en todos los tejidos del cuerpo, por lo que hay una amplia heterogeneidad fenotípica entre los fibroblastos de los diferentes tejidos, así como dentro de un mismo tejido en donde pueden variar en función de las condiciones en las que se hallen (fisiológicas o no) (Souders *et al.*, 2009).

En el corazón, los fibroblastos constituyen entre el 40 y 60% de la población celular total. Durante el desarrollo cardíaco los fibroblastos se desarrollan a partir de células progenitoras pluripotentes o células madre mesenquimales (Baum y Duffy, 2011). En condiciones fisiológicas los fibroblastos cardíacos desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la estructura miocárdica puesto que, son responsables de proporcionarle al corazón un soporte mecánico tridimensional que permite integrar la actividad contráctil de los cardiomiocitos en la acción coordinada de bombeo de las cámaras cardíacas. Se distribuyen por todo el corazón como hebras y láminas entre las fibras musculares cardíacas (Talman y Ruskosho, 2016). Además, se les considera células centinelas encargadas de coordinar estrechamente la síntesis y degradación del colágeno, así como de otros componentes de la matriz extracelular (Nguyen *et al.*, 2014).

A parte de la función de soporte estructural, los fibroblastos también son importantes por su interacción con los cardiomiocitos a través de factores paracrinos y por ser capaces de responder a estímulos mecánicos, químicos y eléctricos (Baum y Duffy, 2011). A pesar de su carácter inexcitable, los fibroblastos cardíacos son capaces de generar

1. Introducción

interacciones directas célula-célula con los cardiomiocitos, a través de proteínas de unión, denominadas conexinas (conexina 40, 43 y 45) (Talman y Ruskosho, 2016).

Bajo condiciones fisiológicas los fibroblastos están protegidos del estrés por la matriz extracelular reticulada. Cuando hay una lesión que produce pérdida de la integridad arquitectónica, los fibroblastos quedan expuestos a tensiones mecánicas, que, junto con hormonas específicas, factores de crecimiento y citoquinas, inducen su migración al área lesionada, convirtiéndose en proto-miofibroblastos (Van den Borne *et al.*, 2010). Éstos se caracterizan por tener una elevada expresión de fibronectina, en especial la variante con el dominio extra-A (ED-A) (tiene funciones proinflamatorias y juega un papel importante en la promoción del fenotipo miofibroblasto) y por la presencia de adherencias focales maduras (adherencias entre la matriz extracelular y la célula). Sin embargo, éstos no expresan la α -actina del músculo liso (α -SMA). Por otro lado, los fibroblastos también son estimulados químicamente por mediadores inflamatorios como el TGF- β e IL-1 β , los cuales participan en la respuesta inflamatoria desencadenada en el corazón lesionado (Bauman y Duffy, 2012). Bajo la influencia del estrés mecánico producido por la tensión mecánica sostenida y la presencia de TGF- β , los proto-fibroblastos finalmente se diferencian en miofibroblastos maduros. Éstos poseen características tanto de los fibroblastos como de las células del músculo liso y no están presentes en el corazón sano.

Las características principales de estas células son su fenotipo migratorio y contráctil, que resulta de la expresión de proteínas contráctiles como la α -actina del músculo liso y la miosina no muscular. Además, poseen una elevada expresión de fibronectina ED-A y de adhesiones focales maduras (Talman y Ruskosho, 2016; Daskalopoulos *et al.*, 2012).

El origen de los miofibroblastos de la zona cicatricial es una cuestión que, aunque poco conocida podría implicar a las abundantes células intersticiales susceptibles de activación por parte de diversos factores, aunque se incluye también la participación de fibroblastos cardíacos "residentes" que, incluso puede que sean la principal vía de aportación de los miofibroblastos. No se descarta la posibilidad de intervención de células endoteliales que han experimentado un proceso de transición mesenquimal y tampoco la participación de células progenitoras de la sangre. Se plantea también la posible intervención de otras células (pericitos, epicárdicas y musculares lisas). No obstante, hay que hacer énfasis en que la importancia relativa de cada fuente celular es un tema no dilucidado (Frangogiannis, 2015). En la figura 1.6 se representan diferentes precursores celulares de miofibroblastos.

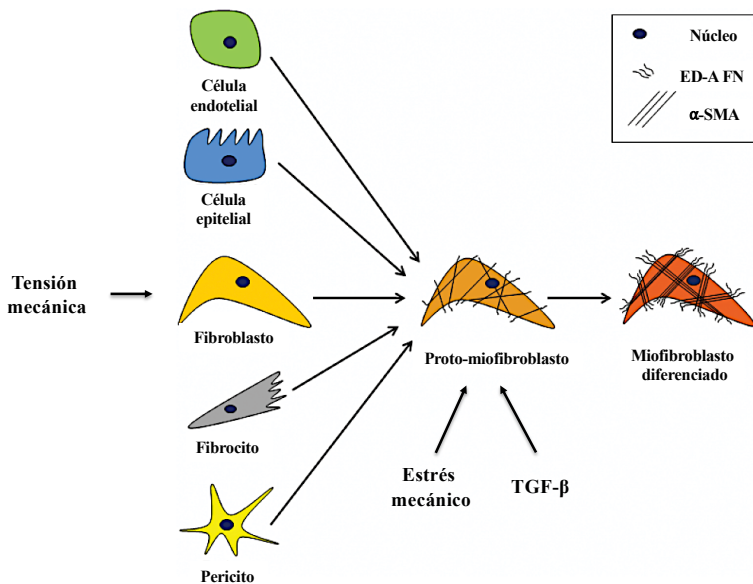


Figura 1.6: Diferentes tipos celulares que pueden diferenciarse en miofibroblastos. Figura modificada y traducida de Daskalopoulos *et al.* (2012).

1. Introducción

La fase proliferativa tras el infarto de miocardio se caracteriza por la formación de un tejido de granulación que comprende macrófagos, miofibroblastos, nuevos vasos sanguíneos y matriz extracelular recién sintetizada (Ma *et al.*, 2017). En concreto los miofibroblastos son atraídos al área de infarto por una gran variedad de factores, y es en este momento cuando empiezan a producir un precursor de colágeno denominado procolágeno que mediante la escisión por proteinasas se transforma en la forma fibrilar madura y activa, principalmente en colágeno tipo I y III. Los miofibroblastos, producen inicialmente una gran cantidad de colágeno intersticial tipo III y posteriormente durante el proceso de reparación del infarto producen colágeno tipo I (Talman y Ruskosho, 2016). Además del colágeno, la matriz extracelular que se forma contiene una gran variedad de proteínas, entre otras, fibronectina, proteoglicano, elastina, proteínas matricelulares, citocinas, factores de crecimiento y proteasas. Todos estos componentes forman una matriz tridimensional que sirve de soporte para “rellenar” los espacios vacíos que dejan los cardiomiocitos muertos a causa de la lesión. De esta forma se consigue mantener la arquitectura del tejido cardíaco y desarrollar la cicatriz (Hervás *et al.*, 2016; Ríos-Navarro *et al.*, 2020-B). Dicha matriz se deposita primero en la zona limítrofe del infarto y posteriormente en la zona central del infarto ya que las células migran a través de la matriz extracelular recién sintetizada. El aumento de colágeno que se produce en la zona lesionada se considera una respuesta adaptativa del tejido cardíaco. El infarto inicia una serie de respuestas paracrinas y hormonales que conducen a cambios en la composición y estructura de la red de colágeno del tejido cardíaco, dando lugar a la fibrosis de la zona infartada como se detallará más adelante. Además, la matriz extracelular es capaz de transmitir señales químicas, mecánicas y eléctricas entre los cardiomiocitos y el resto de las células del tejido cardíaco dañado (Daskalopoulos *et al.*, 2012).

Durante el proceso de reparación del tejido infartado se produce una respuesta angiogénica intensa. Al no suceder dicha respuesta de forma rápida, no se puede formar nueva vasculatura funcional que preserve a los cardiomiocitos isquémicos. Por tanto, la función principal de la angiogénesis en el infarto es proporcionar oxígeno y nutrientes a las células mesenquimatosas que se encuentran metabólicamente activas durante el proceso de reparación del tejido. Se ha visto que las vías de señalización de la angiogénesis siguen cambios dinámicos dentro de las primeras horas de la isquemia (Frangiannis, 2015; Hueso *et al.*, 2017; Ríos-Navarro *et al.*, 2018; Ríos-Navarro *et al.*, 2020-A).

1.2.1.4.3. Fase de maduración del proceso de cicatrización

La fase proliferativa del proceso de reparación cardíaca es seguida por la fase de maduración de la cicatriz. Durante esta fase se producen una serie de alteraciones progresivas en los elementos celulares de la cicatriz, así como en la composición de la matriz extracelular. Se produce la reticulación del colágeno de la matriz extracelular, que es necesaria para conferirle una mayor resistencia a la tracción y a la contracción de la cicatriz, aunque genera una alteración en la geometría de la cámara y contribuye al remodelado en las áreas lejanas al infarto en la pared ventricular (Talman y Ruskosho, 2016).

Además, disminuye la expresión de las proteínas matricelulares y el número de miofibroblastos activados también disminuye considerablemente a medida que la cicatriz va madurando. Los miofibroblastos son privados de las señales clave que promueven su supervivencia y estimulan su actividad sintética. Por otro lado, se inhibe el proceso angiogénico. Las vías de señalización que subyacen a estos procesos son objeto de estudio en la actualidad. Por tanto, la eliminación de

1. Introducción

los factores estimulantes del crecimiento fibrogénico, la de las proteínas matriciales y la activación de señales de “STOP” intracelulares que suprimen la señalización profibrótica contribuyen a la regulación negativa de la fibrosis y la angiogénesis. Se debe tener en cuenta que, los defectos en estas señales supresoras pueden llegar a provocar respuestas fibróticas hiperactivadas y con ello una remodelación cardiaca adversa (Frangogiannis, 2015; Shinde y Frangogiannis, 2014).

Se ha observado que los miofibroblastos residen en el tejido cardiaco durante largos periodos de tiempo. Esta permanencia sugiere que tienen un papel continuo en el mantenimiento de la estabilidad del área infartada. Es más, continúan con su función de producir colágeno fibrilar y se reemplaza la síntesis de colágeno tipo III, que se había sintetizado en las fases iniciales, por la de colágeno tipo I, aún cuando el tejido cicatricial ya ha reemplazado a los cardiomiocitos necróticos. La razón de esta presencia continua de los miofibroblastos en la cicatriz del infarto no está del todo dilucidada. Es posible que sea necesaria para el mantenimiento continuo de matriz extracelular para la contracción cardiaca (Van den Borne *et al.*, 2010; Talman y Ruskosho, 2016). Por otro lado, los miofibroblastos al igual que los fibroblastos, no son células excitables, por tanto, no son capaces de conducir el impulso eléctrico, aunque forman uniones con otros miofibroblastos y otras células como los cardiomiocitos. Dichas uniones están compuestas por conexinas (como la conexina 43 y la conexina 45) (Daskalopoulos *et al.*, 2012).

Conforme el corazón infartado sana, el miocardio que sobrevive exhibe un proceso de remodelación crónica, asociada a hipertrofia de los cardiomiocitos y a cambios fibróticos intersticiales (Humeres y Frangogiannis, 2019). Entre las consecuencias indeseables del remodelado que se produce durante el proceso de cicatrización del tejido dañado, se encuentra fundamentalmente (para revisión ver Frangogiannis, 2015) la

expansión del infarto, que no significa un aumento del número de cardiomiocitos muertos, ni, como consecuencia, un aumento, propiamente dicho, del tamaño del infarto. Se trata del aumento de la longitud del segmento infartado debido al deslizamiento de cardiomiocitos y a la degradación de la matriz, relacionada con activación de proteasas. Dado que la pared del ápex es más delgada y se halla sometida a una tensión más alta, es en esta zona del corazón en donde la expansión se traduce, en muchos casos, en la formación de aneurismas, cuya presencia se asocia a un aumento de la mortalidad. Las complicaciones debidas al remodelado también pueden afectar a zonas no infartadas, en las que se ha observado que, al menos en modelos experimentales, se produce hipertrofia de los cardiomiocitos y alteraciones fibróticas e inflamatorias que se comentan más adelante.

Finalmente, se mencionan otras consecuencias fisiopatológicas del infarto que también aumentan la mortalidad. El choque cardiogénico, la ruptura cardíaca, y las arritmias en las que la cicatriz del tejido infartado y la fibrosis juegan un papel fundamental. El choque cardiogénico es el resultado de la disminución de la perfusión coronaria que produce las consecuencias deletéreas de tipo mecánico ligadas a la desaparición funcional de una importante zona del miocardio. Al disminuir el gasto cardíaco se reduce la presión arterial y por tanto disminuye aún más la presión de perfusión coronaria, siendo esta situación la expresión paradigmática de una retroalimentación positiva y un círculo vicioso (Hall, 2016). El choque cardiogénico es la causa más frecuente de muerte en pacientes ingresados con infarto agudo de miocardio (Thiele *et al.*, 2019).

En cuanto a la ruptura cardíaca, ésta se halla relacionada con la extensión del infarto y con anomalías en las respuestas inflamatorias y reparadoras. Es interesante resaltar que la reperfusión temprana reduce drásticamente la incidencia de ruptura cardíaca y previene la ruptura

1. Introducción

cardíaca tardía que sigue al infarto agudo (Nakamura *et al.*, 1992 y Nakatsuchi *et al.*, 1994, citados por Frangogiannis, 2015).

En lo que respecta a las arritmias en las fases iniciales, las alteraciones del trasiego iónico son la base de los trastornos del ritmo, que pueden llegar a revestir extrema gravedad, como es el caso de las taquicardias ventriculares y de la fibrilación ventricular. Más adelante, una vez formada la escara, en la que la fibrosis juega un papel primordial, se favorecen los fenómenos de reentrada, dado que la cicatriz impone obstáculos a la progresión normal del proceso de excitación. El proceso fibrótico juega un papel fundamental en la creación de zonas que generan discontinuidades en la conducción y “barreras inexcitables” y facilitan el desencadenamiento de arritmias que amenazan la vida (Tritto *et al.*, 2019). Es precisamente un objetivo de primer orden de la presente tesis, actuar sobre el proceso fibrótico con la finalidad de investigar sus repercusiones electrofisiológicas.

1.2.1.5. Estudio especial del proceso fibrótico en el infarto miocárdico

En relación con las consecuencias indeseables del remodelado adverso, comentadas anteriormente, la fibrosis, es decir, la formación de tejido conectivo en respuesta a un daño; se caracteriza por la acumulación de componentes de la matriz extracelular, en particular colágeno, en el sitio de la lesión. Se trata de una respuesta adaptativa y vital que forma parte del proceso de cicatrización y reparación del tejido dañado. Sin embargo, la acumulación continua de proteínas fibróticas (proteínas de la matriz extracelular), conduce a la remodelación permanente del tejido y al deterioro significativo de la estructura y función cardíacas (Murtha *et al.*, 2017). Además, el exceso de matriz extracelular perjudica el acoplamiento mecano-eléctrico de los cardiomiocitos, incrementando así el riesgo de arritmias. La respuesta fibrótica se caracteriza por la activación de los

fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos que, como se ha detallado, son la principal fuente de matriz extracelular en la fibrosis cardíaca (Krenning *et al.*, 2010).

Las vías de señalización que se activan por la muerte de los cardiomiocitos tras sufrir el infarto de miocardio inician cambios reparadores agudos en el corazón que pueden dividirse en fases inicial y tardía. La fase inicial implica el reemplazo del tejido necrótico con formación de cicatrices fibróticas, elongación de cardiomiocitos y adelgazamiento de la zona infartada. Aumenta el volumen del ventrículo como mecanismo de adaptación con el objetivo de mantener el gasto cardíaco y el volumen sistólico normales. La fase tardía implica una elongación de los cardiomiocitos hipertróficos en las áreas no infartadas, un incremento de la masa de la pared y un agrandamiento de la cámara. El ventrículo se dilata y su rendimiento comienza a disminuir. Esta fase tardía puede progresar y resultar finalmente en insuficiencia cardíaca (Murtha *et al.*, 2017). En la tabla 1.1 se presenta un resumen de los distintos procesos celulares que se producen en cada una de las fases de la fibrosis.

1. Introducción

Fibrosis	Infarto de miocardio
Fibrosis temprana	<ul style="list-style-type: none"> • Migración de células inflamatorias como monocitos, macrófagos y neutrófilos a la zona infartada • Aumento de TFG- β estimulado en la quimiotaxis de fibroblastos • Proliferación de fibroblastos y su transdiferenciación estimulada por TFG- β • Inflamación celular • Necrosis de cardiomiocitos • Expansión de la zona de infarto • Incremento de la actividad de metaloproteinasas; descomposición de la red de colágeno • Expresión de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas en la zona de infarto (picos a las 48 h tras el infarto) permitiendo la actividad del colágeno • Elevación de la relación de colágeno-III y colágeno- I • Incremento sistólico y diastólico de la tensión de la pared, adelgazamiento de la pared y dilatación ventricular • Deformación del tejido de las zonas adyacente y lejana a la zona de infarto • Acortamiento miocárdico aumentado e incremento de la frecuencia cardíaca conduciendo a hipercinesia del miocardio no infartado
Fibrosis tardía	<ul style="list-style-type: none"> • Dilatación continua del ventrículo izquierdo • Remodelación general del ventrículo izquierdo y forma distorsionada • Hipertrofia de los cardiomiocitos (aumento del 70% aproximado del volumen celular) • Necrosis de cardiomiocitos continua; reemplazo de los cardiomiocitos por tejido fibrótico • Hipertrofia de la pared del ventrículo izquierdo • Disminución de la relación de colágeno-III y colágeno-I • Acumulación de colágeno (principalmente tipo III y I) en la zona del infarto • Formación de la cicatriz • Hipertrofia completa del ventrículo izquierdo

Tabla 1.1 Tabla resumen de los distintos procesos celulares acontecidos durante la fase temprana y tardía de la fibrosis cardíaca sucedida tras el infarto de miocardio. Tabla tomada y traducida de Murtha *et al.* (2017).

En el desarrollo de la insuficiencia cardíaca junto a la pérdida necrótica de cardiomiocitos durante el infarto de miocardio interviene el remodelado posterior que se produce en la pared del ventrículo izquierdo. En el remodelado patológico, la expansión de la matriz extracelular mediada por fibroblastos se acompaña del crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos, puesto que las células intentan compensar el incremento de la carga de trabajo aumentando de tamaño, para incrementar así la función cardíaca y disminuir la tensión de la pared ventricular. El aumento de grosor causado por la hipertrofia, junto a la rigidez de los cardiomiocitos debido al exceso de colágeno reticulado y la contracción tónica del tejido fibroso mediada por los miofibroblastos, comprometen la función diastólica del corazón. Este proceso de remodelado es progresivo y finalmente conduce al desarrollo de la insuficiencia cardíaca (Talman y Ruskosho, 2016). Actualmente, además de la visión de la insuficiencia cardíaca centrada en los cardiomiocitos, se acepta que alteraciones en la matriz extracelular intersticial y la microcirculación coronaria también juegan un papel importante en el desarrollo de remodelado miocárdico estructural patológico que determina la evolución hacia la insuficiencia cardíaca (González *et al.*, 2018).

Si se utilizan criterios histopatológicos, se pueden reconocer tres tipos de fibrosis cardíaca. La fibrosis de reemplazo implica la generación de tejido cicatricial fibroso en áreas de necrosis de cardiomiocitos y representa la patología predominante en el infarto de miocardio. Este tipo de fibrosis es un proceso fundamental para la prevención de la ruptura de la pared ventricular tras el daño isquémico y se corresponde con los procesos de cicatrización descritos en apartados anteriores (Disertori *et al.*, 2017; Frangogiannis, 2019). El término de fibrosis intersticial se emplea para describir el ensanchamiento del endomisio y el perimisio, debido al depósito de proteínas estructurales de la matriz extracelular. Este tipo de

1. Introducción

fibrosis se define por la acumulación difusa y desproporcionada de colágeno (fibras de colágeno tipo I y III) en relación con la masa de cardiomiocitos dentro del intersticio miocárdico (González *et al.*, 2018; Frangogiannis, 2019). La expansión del área de colágeno peri-adventicial en la microvasculatura cardíaca se denomina fibrosis perivasculare. Estas distinciones entre la fibrosis tienen implicaciones fisiopatológicas y funcionales. En el caso de la fibrosis de reemplazo, representa el resultado final de una respuesta reparadora a la lesión necrótica primaria de los cardiomiocitos, y normalmente se asocia con disfunción ventricular sistólica. Sin embargo, hay otros estímulos perjudiciales, como el estrés mecánico debido a una sobrecarga de presión, la inflamación del miocardio o la desregulación metabólica, que pueden activar las vías profibróticas en ausencia de muerte celular, resultando en cambios fibróticos perivasculares y/o intersticiales. Este tipo de alteraciones se asocian con disfunción diastólica (Frangogiannis, 2019).

En el área de la cicatriz fibrótica persisten miofibroblastos activados, los cuales continúan secretando factores pro-fibróticos. Estos factores pueden difundir hacia las áreas lejanas del miocardio induciendo así, la activación y proliferación de fibroblastos locales y con ello una mayor deposición de colágeno en el compartimento intersticial (fibrosis intersticial) y en la capa adventicia de los vasos coronarios, como arterias coronarias y arteriolas (fibrosis perivasculare). La fibrosis intersticial endurece el miocardio, conduciendo a disfunción diastólica y sistólica, mientras que la fibrosis perivasculare puede causar estrechamiento de la luz del vaso, ocasionando un flujo sanguíneo coronario deteriorado. Dicha condición podría provocar una disminución en el suministro de oxígeno al miocardio, comprometiendo así la supervivencia de los cardiomiocitos y predisponiéndolos a la muerte celular isquémica (Talman y Ruskosho, 2016). En la figura 1.7 se observan diferentes imágenes que hacen

referencia a la síntesis de colágeno y la presencia de miofibroblastos en distintas zonas del tejido cardiaco tras sufrir el infarto de miocardio, así como sus consecuencias una vez ha finalizado el proceso de cicatrización.

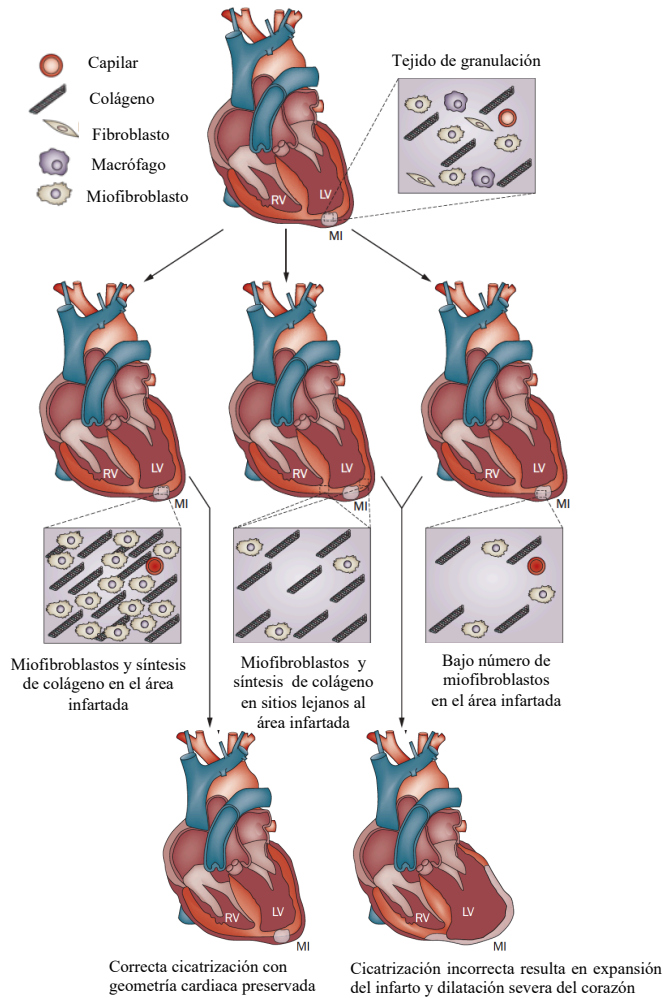


Figura 1.7 Distintos tipos celulares y la síntesis de colágeno en diferentes regiones del tejido cardiaco tras haber sufrido un infarto de miocardio (MI por sus siglas en inglés). En la parte final de la figura se muestran diferentes estados del corazón en función de las características del proceso de cicatrización. RV y LV corresponden a ventrículo derecho e izquierdo respectivamente. Figura tomada y traducida de Van den Borne *et al.* (2010).

1. Introducción

Además de su papel en la disfunción cardíaca, la fibrosis también puede estar involucrada en la patogénesis de las arritmias, al perturbar la conducción del impulso eléctrico, y facilitar el desarrollo de circuitos reentrantes. La composición de la matriz extracelular y el contenido celular del intersticio cardíaco pueden jugar un papel importante en la determinación de la arritmogenicidad en un corazón fibrótico. En modelos experimentales murinos se sugiere que los miofibroblastos de la zona infartada se encuentran eléctricamente acoplados con los cardiomiocitos de la zona limítrofe. Sin embargo, sus respuestas relacionadas con el voltaje muestran cinéticas más lentas, reflejando una conducción eléctrica menor a través de las uniones heterocelulares. Por otra parte, la deposición de matriz extracelular en regiones fibróticas con un bajo contenido celular puede asociarse a una interrupción de la propagación del impulso eléctrico (Frangogiannis, 2019).

En condiciones fisiológicas la red de colágeno se encarga de proporcionar al corazón un soporte físico con el objetivo de mantener la estructura miocárdica y la transmisión de la fuerza, en todo el miocardio. En el corazón sano, dicha red es fina y permite el contacto de célula a célula entre los cardiomiocitos vecinos. En aquellas zonas donde las membranas de los cardiomiocitos están en contacto, hay canales de proteínas (conexinas) que se encargan de conectar los compartimentos citoplasmáticos de las células. Los canales de conexinas permiten el flujo de corriente entre los cardiomiocitos y juegan un papel importante en la propagación del impulso eléctrico a través del corazón. La alteración del contacto célula-célula afecta a la propagación del impulso eléctrico favoreciendo la arritmogénesis (De Jong *et al.*, 2011).

Cuando la patología cardíaca se asocia a un remodelado estructural, como ocurre en el proceso fibrótico tras el infarto de miocardio, dicho

remodelado afecta tanto a la expresión de las conexinas, que se reduce, como a la del colágeno, que se ve incrementada. Ambas alteraciones dan lugar a una reducción en el acoplamiento eléctrico entre célula y célula, conduciendo al deterioro de la propagación del impulso eléctrico que puede dar lugar a consecuencias arritmogénicas como el desencadenamiento de taquicardias y fibrilación ventricular (De Jong *et al.*, 2011).

1.2.1.5.1. Análisis especial del papel de la fibrosis en la génesis de arritmias

Las arritmias cardíacas constituyen un problema clínico relevante puesto que son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. En los países desarrollados, se estima que aproximadamente 17 millones de muertes anuales se producen por causas cardiovasculares y muerte súbita cardíaca, la cual generalmente se debe a arritmias letales, representando aproximadamente el 25% de la mortalidad. Cabe destacar que esta proporción se ve incrementada con la edad a causa de una mayor prevalencia de cardiopatía estructural. Las taquiarritmias ventriculares, compuestas por la taquicardia y la fibrilación ventriculares, representan el 80 % de las muertes súbitas de origen cardíaco (Nguyen *et al.*, 2017).

Las arritmias cardíacas potencialmente letales se producen normalmente por la convergencia de dos factores: uno desencadenante, como puede ser un complejo ventricular prematuro, el cual se encuentra con un sustrato de tejido vulnerable, que es el segundo factor. Esta combinación de factor desencadenante y sustrato vulnerable promueve el inicio de una reentrada anatómica o funcional que puede degenerar en fibrilación ventricular. Se sabe que la fibrosis juega un papel importante en la generación del sustrato de tejido vulnerable, mediante la interposición de haces de colágeno entre los cardiomiocitos. Sin embargo, no está totalmente

1. Introducción

dilucidado el papel que tienen los fibroblastos en la generación de los factores desencadenantes (Nguyen *et al.*, 2014).

En relación con el mecanismo de reentrada, como generador de arritmias, la primera demostración de que puede ocurrir movimiento circular en tejido excitable fue realizada por Mayer (1908) en un tipo de medusa, aplicando estímulos prematuros y generando bloqueos de conducción unidireccionales. Estudios posteriores realizados por Mines (1913) permitieron reproducir en diversos tejidos tanto ventriculares como auriculares de diferentes animales, el movimiento circular (para revisión ver Kleber y Rudy, 2004). Mines demostró que es necesario el establecimiento de un bloqueo unidireccional de la conducción para que se instaure una excitación reentrante. Además, se dio cuenta de que el inicio de la reentrada dependía de la velocidad de conducción y del periodo refractario, cuyo producto es lo que se denomina longitud de onda de la excitación (Mines, 1913, citado por Kleber y Rudy, 2004). Este producto debe ser inferior a la longitud anatómica del circuito reentrante para que se dé el movimiento circular. Mines planteó que, en algunos tipos de reentrada, la onda se propaga en torno a un obstáculo inexcitable, cuyo tamaño permite que el tiempo transcurrido al realizar una vuelta a su alrededor supere los periodos refractarios absoluto y relativo. Cuando un grupo aislado de fibras no se ha activado durante la onda inicial de despolarización, estas pueden excitarse antes de que se extinga el impulso, lo que las posibilita para, a través de estas, re-excitar células anteriormente despolarizadas que ya se encuentran repolarizadas (Gaztañaga *et al.*, 2012).

La reentrada anatómica es uno de los dos grupos principales en los que se clasifica este proceso. Se debe a la existencia de obstáculos anatómicos y por tanto tiene límites de carácter morfológico o estructural. En la reentrada funcional, no hay límites de carácter anatómico. La primera implica la existencia de un obstáculo no excitable, rodeado de tejido

excitable que constituye el circuito reentrante. La onda de excitación, una vez se haya encontrado con el obstáculo anatómico avanzará solamente por una de las dos opciones posibles y dará vueltas alrededor del obstáculo anatómico con lo que se iniciará el circuito reentrante (figura 1.8). En la reentrada funcional, “el circuito no está determinado por obstáculos anatómicos, sino que lo definen las heterogeneidades dinámicas de las propiedades electrofisiológicas del tejido involucrado” (Grant y Durrani, 2007, citados por Gaztañaga *et al.*, 2012) y generalmente se trata de circuitos cortos. Los mecanismos son o bien la existencia de un circuito guía central que es «el circuito más pequeño posible en el que el impulso puede continuar circulando» (Allesie *et al.*, 1976), o bien se trata de mecanismos ligados a la anisotropía del tejido. La conducción anisotrópica hace referencia a la dependencia de la velocidad de propagación del impulso con respecto a la dirección en la que ocurre dicha propagación en el músculo cardíaco y depende de la estructura y organización de los cardiomiocitos (Gaztañaga *et al.*, 2012).

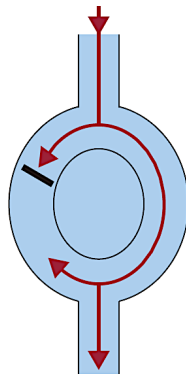


Figura 1.8 Representación de una reentrada anatómica, en la que el obstáculo central establece dos vías. Cuando el impulso llega al circuito puede producir un bloqueo unidireccional, y la conducción lenta a través de la otra vía permite el inicio de la reentrada. Figura tomada de Gaztañaga *et al.* (2012).

En el infarto de miocardio el papel del sustrato y de las reentradas determinadas por la presencia de obstáculos anatómicos tiene especial

1. Introducción

relevancia. La fibrosis cardiaca interviene en diversos mecanismos electrofisiológicos responsables de la arritmogénesis: propagación retardada del potencial de acción, postdespolarizaciones, reentrada e incremento de la automaticidad ectópica (Nguyen *et al.*, 2017).

La fibrosis se puede clasificar en función de los diferentes patrones o texturas que presenta: compacta, irregular (o parcheada), intersticial y difusa (figura 1.9). Estos patrones poseen diferentes perfiles arritmogénicos puesto que no afectan de igual manera a dos de las características clave que juegan un papel crítico en la facilitación de la reentrada funcional y anatómica. Estas características, como se ha detallado, son la conducción lenta y la susceptibilidad al bloqueo de la conducción unidireccional; por tanto, la fibrosis es capaz de generar un sustrato vulnerable para la actividad reentrante (Nguyen *et al.*, 2014).

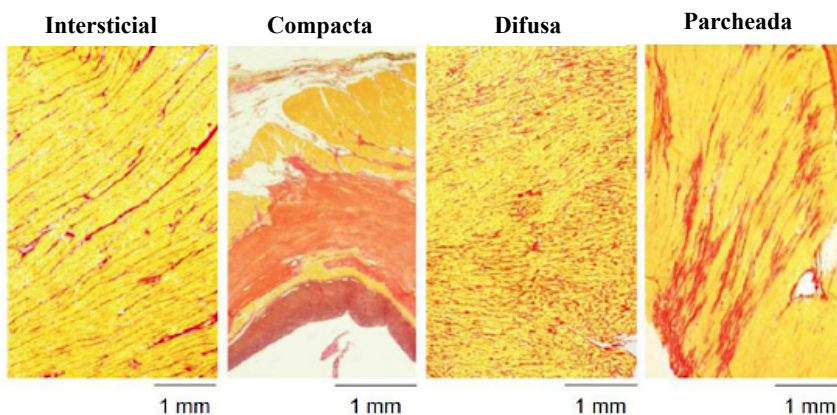


Figura 1.9 Patrones de la fibrosis cardiaca, el color rojo hace referencia al colágeno, mientras que el color amarillo hace referencia al miocardio. Figura tomada y traducida de De Jong *et al.* (2011).

La fibrosis compacta se caracteriza por, la existencia de grandes áreas densas de colágeno que carecen de cardiomiocitos como ocurre tras un infarto de miocardio. Estas áreas tienen un potencial arritmogénico bajo

ya que, las grandes cicatrices macroscópicas no promueven la conducción lenta ni aumentan la susceptibilidad al bloqueo unidireccional de la conducción por sí mismas, aunque las cicatrices grandes pueden proporcionar un obstáculo inexcitable que ancle un circuito reentrante. Sin embargo, la arritmogenicidad aumenta cuando la fibrosis compacta de las cicatrices macroscópicas se encuentra rodeada por una zona limítrofe en la que coexisten otros patrones de fibrosis en diferentes grados (De Jong *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2014). En esta región limítrofe los cardiomiocitos se encuentran intercalados con el tejido fibrótico y fibroblastos. Aquellas áreas que presenten fibrosis parcheada o irregular y fibrosis intersticial severa poseen mayor potencial arritmogénico para iniciar la reentrada. En estas regiones los haces de cardiomiocitos se conectan entre sí de forma leve, debido a que entre ellos hay tabiques de colágeno que dificultan o interrumpen el acoplamiento eléctrico. Esto hace que el tejido esté más predispuesto a que haya conducción lenta, “discontinua” y en “zigzag”, así como bloqueos unidireccionales de la conducción debido a desajustes del tipo fuente-sumidero entre los cardiomiocitos y el tejido adyacente acoplado normalmente (Nguyen *et al.*, 2017). Además, los haces que están interconectados pueden formar canales que proporcionan el sustrato para los circuitos de reentrada anatómica. La manifestación clínica son las taquicardias ventriculares monomórficas facilitadas por la conducción lenta (Nguyen *et al.*, 2014; De Jong *et al.*, 2011). Este mecanismo se representa de forma esquemática en la figura 1.10. Por tanto, entre los cardiomiocitos hay tabiques de colágeno no conductores que disminuyen la conducción y aumentan la anisotropía (Disertori *et al.* 2017).

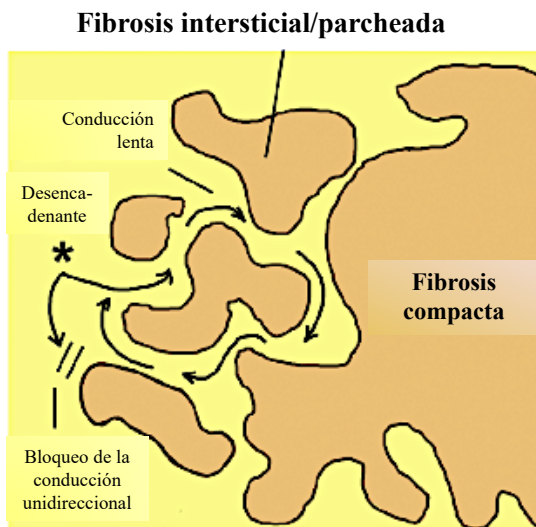


Figura 1.10 Esquema de dos tipos diferentes de fibrosis. La fibrosis irregular o parcheada cerca de la fibrosis compacta enlentece la conducción, provoca bloqueos unidireccionales y en presencia de actividad desencadenada se favorece el inicio de actividad reentrante. Figura tomada y traducida de Disertori *et al.* (2017).

La fibrosis difusa se caracteriza por la presencia de tabiques cortos de colágeno intercalados entre las fibras miocárdicas. También posee potencial arritmogénico ya que se produce una disminución selectiva en las conexiones que hay entre los cardiomiocitos, que enlentece la propagación de las ondas de activación, de forma transversal e incrementa la anisotropía, predisponiendo a la ruptura del frente de onda y a la reentrada funcional. Además, el desacoplamiento eléctrico puede promover alternancias en la duración del potencial de acción, así como dispersión en la refractariedad. Cuando la reentrada se inicia en estas condiciones, normalmente no se halla anclada a una vía anatómica bien definida, por lo que clínicamente resulta en taquicardia ventricular polimórfica en lugar de monomórfica (Nguyen *et al.*, 2014). El miocardio infartado es potencialmente arritmogénico debido a la presencia de diferentes patrones de fibrosis en distintos grados en la zona limítrofe. Dichos patrones poseen un perfil más arritmogénico que los

de aquellas zonas en las que la fibrosis es de mayor densidad, como es el caso de la cicatriz. En la zona limítrofe se crean canales de conducción lenta que predisponen al bloqueo unidireccional, mientras que en las zonas con mayor densidad de fibrosis no hay conducción.

A continuación, se detallan, los efectos que puede originar la fibrosis sobre aquellas propiedades clave que hacen posible la actividad reentrante: la conducción lenta y el bloqueo unidireccional de la conducción.

1.2.1.5.2. Papel de la fibrosis en la conducción lenta

La fibrosis intersticial hace que los cardiomiocitos se encuentren escasamente interconectados y eléctricamente aislados entre sí, debido a la interposición de las fibras de colágeno. Esta separación deteriora la conducción transversal, aunque permite que la conducción longitudinal se mantenga prácticamente inalterada. Si la cantidad de fibrosis aumenta, la propagación perpendicular a la dirección de la fibra se vuelve asíncrona y sigue una ruta tortuosa entre las barreras eléctricas impuestas por las fibras de colágeno. Por tanto, la fibrosis puede favorecer que la propagación eléctrica adopte un patrón en zigzag a través del tejido cardiaco. Dicha tortuosidad incrementa la longitud de la ruta que debe recorrer la activación y con ello el tiempo de conducción (De Jong *et al.*, 2011). El frente de onda de repolarización también puede retrasarse, resultando en un aumento de la dispersión de la repolarización. Ésta es otra de las condiciones que pueden favorecer los circuitos reentrantes (Francis Stuart *et al.*, 2016).

Por otro lado, los efectos de la fibrosis van a verse agravados por el remodelado que se produce en las uniones intercelulares y en la actividad de los canales iónicos, que altera las características del potencial de acción de los cardiomiocitos de la zona limítrofe al infarto. Se produce una

1. Introducción

reducción del acoplamiento eléctrico entre los cardiomiocitos que reduce aún más la conducción. Así en los corazones que han sufrido un evento isquémico, hay una regulación a la baja de la conexina 43 de tal modo que se pierden o se redistribuyen las uniones formadas por dicha conexina en los discos intercalados, también se altera el coeficiente de difusión longitudinal y, por tanto, la velocidad de conducción a lo largo del eje principal de las fibras (Nguyen *et al.*, 2014).

1.2.1.5.3. Papel de la fibrosis en el bloqueo unidireccional de la conducción

El bloqueo unidireccional de la conducción es otro de los factores que se requiere para iniciar la reentrada. Clásicamente, el bloqueo funcional se ha atribuido la dispersión de la refractariedad. Bajo este escenario, un complejo ventricular prematuro con un intervalo de acoplamiento que cae entre dos periodos refractarios, corto y largo, se bloquea en la región con periodo refractario largo y se propaga por aquella que posee el periodo refractario corto. Si la conducción es lenta y existe un retraso suficiente para que el impulso pueda volver a entrar en la región previamente bloqueada, es decir, la de periodo refractario largo, después de que esa región haya recuperado la excitabilidad, se puede iniciar la reentrada. En condiciones patológicas como es el caso del infarto de miocardio, el remodelado eléctrico interviene en mayor medida en la dispersión de la refractariedad (Nguyen *et al.*, 2014).

Sin embargo, hay otro mecanismo por el cual la fibrosis es capaz de producir el bloqueo unidireccional de manera directa. Este mecanismo es el conocido como desajuste fuente-sumidero, que ocurre cuando un área de tejido excitado (la fuente) genera una corriente de despolarización insuficiente para excitar al tejido vecino (el sumidero). Este fenómeno suele suceder en sitios de expansión del frente de activación (por ejemplo, un

frente de onda despolarizante que viaje desde una estructura estrecha a una más grande), o cuando existen pequeñas islas de tejido activado rodeadas de miocardio quiescente o inactivo. Normalmente este tipo de desajuste actúa para proteger al miocardio normal de la actividad ectópica. Sin embargo, en el caso de la fibrosis intersticial, este tipo de desajuste favorece la aparición de desencadenantes ectópicos (Francis Stuart *et al.*, 2016).

Por tanto, los desajustes fuente-sumidero causados por la fibrosis y la dispersión de la refractariedad debido al remodelado eléctrico contribuyen de forma independiente a que aumente la probabilidad de que se produzca un bloqueo unidireccional de la conducción y con ello que aparezca actividad reentrante, responsable del desencadenamiento de una taquicardia y/o fibrilación ventricular. Estos factores junto con el enlentecimiento de la conducción hacen que el tejido cardíaco fibrosado sea altamente vulnerable al inicio de la reentrada desencadenada por un complejo ventricular prematuro (Nguyen *et al.*, 2014).

1.2.1.5.4. Efectos proarrítmicos de los fibroblastos/miofibroblastos en los cardiomiocitos

A continuación, se detalla cómo los fibroblastos pueden alterar la electrofisiología cardíaca y contribuir también a la generación de arritmias a través de diversos mecanismos.

En el miocardio existen al menos cuatro posibilidades diferentes de interacciones entre fibroblastos y cardiomiocitos que pueden dar lugar a alteraciones de la función cardíaca y promover la arritmogénesis: 1) incremento anormal del tejido conectivo; 2) interacciones paracrina; 3) *feedback* mecano-eléctrico; 4) interacciones electrotonicas directas (Rohr, 2012). En cuanto a las interacciones paracrina entre los cardiomiocitos y los fibroblastos cardíacos, se sabe que estos últimos liberan diversos

1. Introducción

factores que contribuyen al remodelado patológico y es posible que estos mismos factores también contribuyan a la arritmogénesis. Se ha visto que los factores paracrinos liberados por los fibroblastos cardiacos modulan parámetros como el potencial de acción de los cardiomiocitos, así como propiedades relacionadas con la conducción eléctrica. En estudios llevados a cabo por Vasquez y Morley (2012) se demuestra que estos efectos se ven incrementados tras la lesión cardiaca. Estos autores, mediante estudios de expresión génica observaron que en cardiomiocitos tratados con factores paracrinos de fibroblastos se produce una disminución de la expresión de la corriente rápida de sodio, la corriente interna rectificadora de potasio y la corriente transitoria de potasio (Ito). Por otro lado, observaron que la expresión, fosforilación y función de la conexina 43 de los cardiomiocitos no eran afectadas por dichos factores paracrinos.

La conducción lenta se ve favorecida al aumentar la densidad de fibroblastos cardiacos. Además, los fibroblastos también pueden contribuir al inicio de la arritmia influyendo en el automatismo. Esto es, el aislamiento eléctrico parcial de células espontáneamente activas, mediante su acoplamiento a fibroblastos, puede facilitar la conducción desde focos ectópicos. Por otro lado, también se ha demostrado que las interacciones entre fibroblastos y cardiomiocitos pueden resultar en un automatismo inducido por la despolarización de los cardiomiocitos circundantes. Además, los fibroblastos pueden aumentar dicho automatismo mediante el incremento del estrés oxidativo y/u osmótico en los cardiomiocitos (Vasquez y Morley, 2012). Estos procesos se pueden observar en la figura 1.11. Por tanto, cuando el acoplamiento entre los miofibroblastos y cardiomiocitos se da en condiciones patológicas, puede ser un factor adicional para la formación de actividad desencadenada por despolarizaciones diastólicas tempranas (EADs) o tardías (DADs), especialmente cuando se combina con los efectos del tipo fuente-sumidero

que produce la fibrosis. Esto ocurre especialmente en aquellas áreas del tejido con fibrosis intersticial y parcheada. La despolarización de la membrana favorece la formación de actividad desencadenada en aquellas regiones donde el medio fuente-sumidero es favorable y en aquellas zonas donde la conducción lenta coexiste con el incremento de la susceptibilidad al bloqueo unidireccional de la conducción, esta combinación es perfecta para el inicio de arritmias (Nguyen *et al.*, 2014).

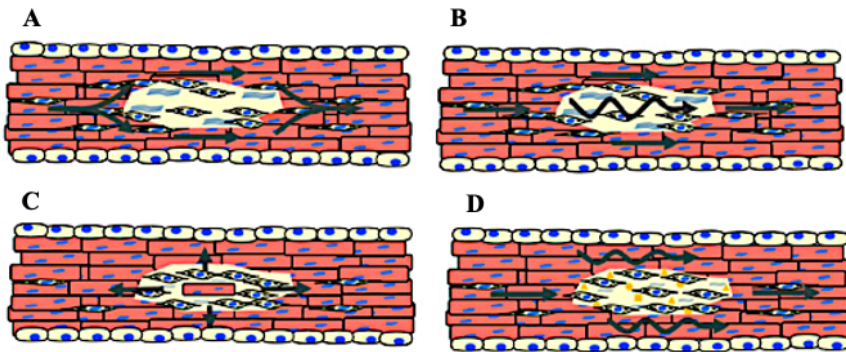


Figura 1.11 Mecanismos arritmogénicos de las interacciones entre cardiomiocitos y fibroblastos. A) Regiones fibróticas hacen de barrera física o funcional para la conducción eléctrica, haciendo que los frentes de onda que se encuentran con dichas regiones se fragmenten en el lado proximal y se reconecten en el lado distal. B) El acoplamiento eléctrico entre fibroblastos-cardiomiocitos permite una conducción electrotonica lenta a través de estas regiones fibróticas. C) El aislamiento eléctrico parcial de los cardiomiocitos puede dar lugar a que se produzca una conducción eléctrica exitosa de aquellos impulsos que se originan en los focos ectópicos. D) Los mediadores químicos liberados por los fibroblastos pueden ejercer efectos paracrinos sobre los cardiomiocitos dando lugar a una conducción lenta. (Figura tomada de Vasquez y Morley (2012).

Como se ha comentado anteriormente, los fibroblastos cardíacos son una población celular fenotípicamente heterogénea. Especialmente presentan diferencias en las corrientes iónicas y en la expresión de conexinas, las cuales tienen importantes implicaciones en la modulación del sustrato arritmogénico. Estudios sobre la expresión de conexinas bajo

1. Introducción

condiciones patológicas, muestran que los fibroblastos, en el tejido cicatricial que se produce tras el infarto, expresan conexina 43 y 45 con patrones espacial y temporalmente diferentes. En primer lugar, los fibroblastos que expresan la conexina 45 se infiltran en el tejido dañado durante las primeras horas tras el infarto, alcanzando su máxima densidad a los 6 días, y disminuyendo posteriormente. Por otra parte, el número de fibroblastos que expresan conexina 43 empieza a aumentar a los 6 días tras el infarto, continuando su incremento al menos hasta la cuarta semana tras el daño. Esto sugiere que la conexina 45 es responsable del acoplamiento eléctrico entre los fibroblastos y cardiomiocitos durante el proceso de remodelado agudo, mientras que la conexina 43 está implicada en fases más tardías del remodelado. Se desconoce si estas células representan una sola población de fibroblastos que en un primer momento expresan conexina 45 y luego conexina 43, o si por el contrario hay múltiples poblaciones de fibroblastos involucradas. Recientemente se ha visto que tanto los niveles de conexina como el acoplamiento a los cardiomiocitos se ve incrementado tras la lesión cardíaca, hecho que aumenta el potencial de los fibroblastos para influir en las propiedades electrofisiológicas de los cardiomiocitos (Vasquez y Morley, 2012).

1.2.2. Papel de las desacetilasas de histonas en la fibrosis

Las histonas son un conjunto de proteínas que asociadas al ADN forman parte de la cromatina. Esta asociación es posible gracias a que estas proteínas son ricas en aminoácidos básicos como la lisina. Se trata de aminoácidos di-amino-mono carboxílicos que al poseer residuos aminos libres, no utilizados para unirse al grupo carboxilo de los aminoácidos adyacentes en la proteína, se pueden acetilar. Los grupos acetilo son reconocidos por dominios proteicos que se denominan bromodominios. Todo ello facilita que estos bromodominios también puedan unirse con alta

selectividad a proteínas acetiladas en la lisina a través de interacciones específicas con residuos de aminoácidos flanqueadas por acetil-lisina. Los bromodominios están presentes en decenas de proteínas, como es el caso de las acetiltransferasas y, lo que es especialmente importante, en factores de transcripción (para revisión ver Noguchi-Yachide, 2016). Los bromodominios reconocen a las histonas acetiladas; reconocen la forma espacial de los residuos acetilados y la activación del gen pasa por este reconocimiento. Por el contrario, la desacetilación obviamente y por las mismas razones va a dificultar la expresión del gen. Los resultados de diferentes investigaciones parecen demostrar que el reconocimiento de los grupos acetil-lisina por los bromodominios puede ser básico para regular las interacciones entre proteínas en procesos tales como la activación de la transcripción (Zeng y Zhou, 2002).

Las histonas van a determinar el grado de empaquetamiento de la cromatina, jugando un importante papel en la regulación de la expresión génica en función del grado de acetilación que presenten. El proceso de acetilación es una modificación clave producida en las histonas cuyo papel es la modulación de diversos procesos celulares dependientes del ADN. Dichos procesos pueden ser la transcripción, la remodelación de la cromatina, el ciclo celular, la diferenciación celular y el daño o reparación del ADN. Esta acetilación de las histonas está regulada por las enzimas conocidas como histonas acetiltransferasas (HAT), por proteínas que contienen bromodominios, y también las enzimas encargadas de revertir el proceso que son las desacetilasas de histonas (HDAC). Se considera que la disfunción de estos procesos desempeña un papel importante en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades, como el cáncer y las enfermedades inflamatorias (Noguchi-Yachide, 2016). Al acetilarse las histonas varía su carga y por tanto la interacción con el ADN, dando lugar a un menor grado de compactación de la cromatina. Esto hace posible que

1. Introducción

los bromodominios sean capaces de reconocer los residuos de lisina N-acetilados de las histonas, actuando así, como un regulador de las interacciones proteína-proteína en numerosos procesos celulares, incluida la transcripción y remodelación de la cromatina. Por tanto, forman parte del inicio de la transcripción génica. Las desacetilasas de histonas se encargan de revertir dicho proceso. Es decir, su objetivo es catalizar la eliminación de los grupos acetilo de las lisinas en los extremos N-terminal. La desacetilación permite que la histona recupere su carga positiva, recuperándose por tanto la atracción electrostática con los grupos fosfatos del ADN; esto da lugar a un mayor grado de compactación de la cromatina, impidiendo además la interacción con los bromodominios, al no estar acetilados los residuos de lisina, por lo que se bloqueará la transcripción génica.

Además de las proteínas histónicas, se han identificado multitud de sustratos de las desacetilasas de histonas no histónicas, y se ha relacionado la actividad de estas enzimas con múltiples procesos celulares además de la regulación génica, como la hipertrofia cardíaca, la autofagia, la fibrosis, la contractilidad y el metabolismo energético (McKinsey, 2012). En mamíferos hay cuatro clases de desacetilasas de histonas que abarcan 18 isoformas diferentes, cada una de las cuales está codificada por distintos genes. Por un lado, están las HDAC de clase I (1,2,3 y 8), las HDAC de clase II (subtipo IIa son HDAC 4,5,7 y 9 y subtipo IIb son HDAC 6 y 10) y las de clase IV (HDAC 11), todas ellas son enzimas dependientes del zinc para su actividad catalítica y contienen un dominio de desacetilasa altamente conservado. Por otro lado, están las HDAC de clase III también denominadas sirtuinas (SirT 1-7); éstas en cambio necesitan dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) para su actividad catalítica (Schuetze *et al.*, 2014).

Las enzimas desacetilasas de histonas están emergiendo como reguladores clave de la fibrosis cardiaca, a pesar de que los mecanismos celulares por los cuales promueven la fibrosis siguen sin estar dilucidados hoy en día (Bagchi y Weeks, 2019). En la pasada década se realizaron múltiples estudios que demostraron que las enzimas HDAC están involucradas en el inicio y progreso de la fibrosis en múltiples órganos incluyendo el corazón, pulmón, hígado y riñón. La fibrosis cardiaca juega un papel crítico en el remodelado cardiaco participando en los cambios estructurales y funcionales que se producen en respuesta a un estrés patológico como lo es el infarto de miocardio. Un depósito excesivo de matriz extracelular, como colágeno y fibronectina, deteriora la función cardiaca, dificulta la conducción eléctrica y predispone a arritmias que amenazan la vida (Lyu *et al.*, 2019).

Williams *et al.* (2014) realizaron un estudio en el que, a través del uso de inhibidores selectivos de isoformas de las HDAC, observaron que las HDAC de clase I son reguladores clave de la fibrosis cardiaca, cumpliendo funciones fibrogénicas duales ya que, promueven la activación de fibroblastos cardiacos y controlan la diferenciación de los fibrocitos derivados de la médula ósea. Se ha visto que los fibrocitos son capaces de adoptar un fenotipo mesenquimal y contribuir al remodelado tisular en respuesta al estrés patológico.

Durante el proceso de remodelación cardiaca hipertrófica se activa una compleja red de cascadas de señalización. En diversos estudios se ha visto que las desacetilasas de histonas forman parte de estas vías divergentes de respuesta al estrés. La primera conexión entre las HDAC y el remodelado cardiaco fue el descubrimiento de que las HDAC de clase IIa interaccionan con el factor potenciador de miocitos 2 (MEF2), en ausencia de señales de estrés para atenuar el crecimiento cardiaco. MEF2 es un regulador clave de la hipertrofia miocárdica (Berry *et al.*, 2008). En

1. Introducción

estudios posteriores se vio que MEF2 interactúa con HDAC4, HDAC5, y HDAC9 pertenecientes a la clase IIa. Una sobreexpresión de estas HDAC disminuye la expresión de MEF2 y atenúa la hipertrofia miocárdica (Zhang *et al.*, 2002). Esto es importante puesto que la hipertrofia cardíaca es tanto una causa como un resultado de la fibrosis cardíaca. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las HDAC de clase IIa también ejercen funciones profibróticas. Así en un modelo de infarto de miocardio en ratones de 6 meses, la sobreexpresión de HDAC4 específica de cardiomiocitos promueve la hipertrofia cardíaca y exacerba la fibrosis intersticial. En otro modelo de hipertrofia cardíaca y fibrosis con ratones *knockout* del receptor-A del péptido natriurético, la expresión de HDAC7 es regulada al alza en paralelo con un incremento de TFG- β 1 y colágeno I (Ellmers *et al.*, 2007; Lyu *et al.*, 2019).

Además de que las HDAC de clase IIa estén involucradas en el remodelado cardíaco, estudios genéticos sugieren que las HDAC de clase I y IIb también participan. En un estudio con fibroblastos cardíacos primarios de rata y de ratones hipertensos se observó una regulación a la baja de HDAC1 y HDAC2 por el ácido gálico y una atenuación de la fibrosis cardíaca (Jin *et al.*, 2017). Por otro lado, HDAC3 está regulada al alza en un modelo experimental de insuficiencia cardíaca y su supresión mejora la función cardíaca y limita la fibrosis ventricular (Sharifi-Sanjani *et al.*, 2014).

En estudios basados en la utilización de inhibidores de las HDAC, también se ha observado que las desacetilasas de histonas funcionan como moléculas proinflamatorias que desencadenan la secreción de citoquinas pro-fibróticas (Hull *et al.*, 2016). Se han asociado varios subtipos de HDAC con el proceso inflamatorio, ya que, en aquellas células estimuladas con interferón gamma, las HDAC se acumulan en la región promotora provocando la expresión de genes requeridos para la respuesta inflamatoria.

Se han identificado específicamente a HDAC1, HDAC2 y HDAC3 como reguladores inflamatorios en las células epiteliales y en fibroblastos como los sinoviocitos, respectivamente (Angiolilli *et al.*, 2017; Yoon *et al.*, 2019). Un incremento en la expresión de HDACs estimula la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (Guo *et al.*, 2009). Durante el proceso inflamatorio crónico desde los sitios de la inflamación varias citoquinas estimulan la diferenciación de miofibroblastos, indicando que las propiedades antiinflamatorias también podrían regular la fibrosis de manera indirecta. En cambio, numerosos estudios muestran que hay una regulación directa de la diferenciación de los miofibroblastos por parte de las desacetilasas de histonas (Glenisson *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2019).

En estudios con inhibidores de las HDAC se ha observado una reducción de la diferenciación de los miofibroblastos desencadenada por TGF- β . Las HDACs además incitan a la formación de matriz extracelular. Por otro lado, HDAC1 y HDAC2, como componentes de Sin3A (proteína con hélices emparejadas anfipáticas, reguladora de la transcripción) bloquea epigenéticamente la síntesis de colágeno de manera sincrónica. Por tanto, se sabe que las desacetilasas de histonas participan en diferentes pasos del proceso fibrótico y por ello se piensa que su inhibición podría ser importante para prevenir la progresión de la fibrosis (Yoon *et al.*, 2019). Hay estudios que sugieren que la inhibición de las desacetilasas de histonas logra tres efectos beneficiosos sobre el miocardio sometido a estrés patológico; éstos son: atenuación del crecimiento hipertrófico, un rendimiento contráctil preservado y una disminución de la fibrogénesis. Por tanto, es de esperar que estos efectos mejoren el llenado diastólico y el gasto cardiaco, aliviando así los síntomas de la insuficiencia cardiaca congestiva (Berry *et al.*, 2008).

Por tanto y por todas las investigaciones y observaciones indicadas anteriormente, viene siendo objeto de estudio el papel que tienen las

1. Introducción

desacetilasas de histonas en los procesos patológicos de remodelado ventricular izquierdo, que incluyen hipertrofia, apoptosis, necrosis, alteraciones metabólicas, alteraciones de la contractilidad y fibrosis cardiaca (Xie y Hill, 2013).

Uno de los principales objetivos de la presente tesis es el estudio de las alteraciones de diversas propiedades electrofisiológicas miocárdicas y de la inducibilidad de arritmias ventriculares producidas por la isquemia/reperfusión, y su posible modificación por efecto de la inhibición de las desacetilasas de histonas.

1.2.2.1. Inhibición de las desacetilasas de histonas en el contexto de la protección del miocardio

1.2.2.1.1. Generalidades sobre la protección miocárdica

La reducción del tamaño del infarto y sus consecuencias adversas tanto mecánicas como electrofisiológicas forma parte de lo que tradicionalmente se ha denominado “protección miocárdica”. Esta protección es un objetivo prioritario en el ámbito de la cardiología. Las bases fisiopatológicas de las maniobras encaminadas a la protección del miocardio isquémico, ya iniciadas aproximadamente en el tercer tercio del siglo pasado, han sido múltiples, aunque la maniobra que ha conseguido una protección mayor ha sido la reperfusión, pese a que no está exenta de producir efectos deletéreos, como se ha comentado en apartados anteriores.

La protección miocárdica fue planteada a través de la actuación sobre los siguientes mecanismos (Lerch y Benzi, 1990):

1. Reducir las necesidades miocárdicas de oxígeno y energía, actuando directa o indirectamente a través de la modificación de la tensión intramiocárdica, el estado contráctil y la frecuencia cardiaca, que son

- los principales determinantes de las necesidades energéticas del corazón (Canty y Ducker, 2016). En este planteamiento se ha basado el uso de bloqueantes de los receptores alfa o beta adrenérgicos, de la nitroglicerina, de los antagonistas del calcio, o de los inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina I.
2. Estimular la producción de energía por otras rutas metabólicas no dependientes de oxígeno, administrando la solución propuesta por Sodi Pallarés de glucosa-insulina-potasio (GIK) y cuya finalidad es estimular el aporte y la utilización de glucosa por los cardiomiocitos isquémicos. Requiere una buena circulación colateral con el fin de que esta solución aborde lo más posible al tejido isquémico.
 3. Facilitar la penetración de nutrientes desde el miocardio sano al isquémico a través del tejido intersticial. Ello implica la despolimerización del ácido hialurónico, constituyente de la sustancia intercelular, mediante el uso de heteropolisacaridasas (hialuronidasa).
 4. Aumentar la irrigación miocárdica, mediante el uso de vasodilatadores potentes (nitroglicerina, antagonistas del calcio, inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina I) y el uso de dispositivos como el balón de contrapulsación aórtica.
 5. Mantener la integridad estructural de la célula isquémica evitando procesos hidrolíticos como los que desencadenan su disrupción mediante el uso de glucocorticoides. En el mismo sentido se han investigado antiinflamatorios que inhiben la síntesis de leucotrienos a través de su actuación sobre la lipooxigenasa.
 6. También, el hecho demostrado de que en el miocardio isquémico no reperfundido hay participación de los radicales libres, ha llevado al uso de captadores (“scavengers”) de los mismos, de cuyos efectos beneficiosos dan cuenta las investigaciones llevadas a cabo por nuestro

1. Introducción

grupo y sobre lo que hemos querido hacer énfasis (Such *et al.*, 1986, 1993; Zaragoza *et al.*, 1988; Alberola *et al.*, 1991).

Si bien las intervenciones citadas anteriormente pueden enlentecer la evolución del infarto hacia el tamaño definitivo que tendría sin tales intervenciones, ninguna de estas maniobras ha evitado que a las setenta y dos horas la extensión del tejido necrosado difiera de la alcanzada en un grupo control sin tratamiento.

La maniobra que puede reducir el tamaño del infarto de modo permanente es la que implica restituir precozmente el flujo sanguíneo coronario a los valores previos a la oclusión arterial, es decir, la reperfusión (para revisión ver Such *et al.*, 1992). Esta intervención, si bien podía realizarse a nivel experimental, no era así en seres humanos, hasta que se realizaron las primeras angioplastias percutáneas hace alrededor de cuatro décadas. Los procedimientos quirúrgicos basados en las técnicas del “bypass” coronario también permiten la reperfusión, aunque su ámbito de aplicación se centra en mejorar la irrigación miocárdica en situaciones de obstrucción crónica. No obstante lo dicho para la reperfusión, ésta no se halla exenta de producir efectos deletéreos como la activación del complemento, de las plaquetas y la formación de tapones de leucocitos agregados que originan el fenómeno de “no reflujo”, la producción de radicales libres derivados del oxígeno y de otras moléculas, la formación de bandas de contracción anómala, la alteración de la función mitocondrial que lleva a la apoptosis, y procesos que se derivan de la activación de proteasas citosólicas y de fosfolipasas de la membrana celular que transformando la lecitina en lisolecitina, desestructuran la membrana y facilitan la arritmogénesis. Otros procesos también implicados en el daño miocárdico por reperfusión son el edema celular y la hemorragia que se produce como consecuencia de la lesión a nivel de la microcirculación (Flaherty y Weisfeldt, 1988).

Dados los efectos deletéreos de la reperfusión post-isquémica, se han ido investigando intervenciones para actuar sobre dichos efectos, que enmascaran en parte la protección exhibida por la reperfusión. Son especialmente destacables las actuaciones encaminadas a contrarrestar los efectos indeseables producidos como consecuencia del estrés oxidativo que originan los radicales libres. Inhibidores de la producción de radicales libres, captadores de los mismos y en general lo que se denomina terapia antioxidante, como son la superóxido dismutasa, la catalasa, el manitol, la metionina, la cisteína, el glutatión, o la desferrioxamina, han probado su efecto beneficioso, en modelos experimentales, tanto en lo que corresponde a la prevención de arritmias como en lo relacionado con la magnitud de la lesión isquémica (Such *et al.*, 1992). La protección ejercida por sustancias que disminuyen los radicales libres derivados del oxígeno sigue siendo objeto de estudio en la actualidad, como lo demuestran recientes investigaciones al respecto (Pérez-Torres *et al.*, 2019).

También se han estudiado las intervenciones que han tenido por objeto inhibir la activación de los leucocitos, bien administrando fármacos con mecanismos de acción a nivel de los factores responsables de su activación o bien provocando una depleción de leucocitos, tal y como se señala en la revisión citada anteriormente.

Un punto de vista abordado por nuestro grupo fue disminuir los efectos lesivos de la endotelina durante los procesos de isquemia y reperfusión mediante la inhibición de su síntesis y el bloqueo de los receptores de estas (Alberola *et al.*, 2000).

Sin embargo, uno de los factores más implicado en el daño producido por la reperfusión, es, sin duda, la sobrecarga intracelular de calcio que se produce como consecuencia de la restitución del flujo coronario. Un mecanismo por el cual se produce sobrecarga de calcio en el

1. Introducción

miocardio isquémico y reperfundido está ligado a la activación del intercambiador sodio/protón (NHE). Éste se halla inactivo a valores fisiológicos del pH intracelular, pero se activa en respuesta a la acidosis intracelular que se desarrolla rápidamente durante la isquemia miocárdica. El miocardio, en situación de isquemia obtiene la energía mediante glucólisis anaerobia que produce acumulación de ácido láctico dentro de la célula. Esta provoca la acidosis intracelular que activa al NHE para restaurar el pH, expulsando de la célula el exceso de H^+ e intercambiándolos por iones Na^+ , con lo que se produce un aumento de la concentración de Na^+ intracelular. Se ha sugerido que, en estas condiciones de isquemia, los protones liberados desde el interior de la célula se acumulan en el líquido extracelular, con lo que desaparece el gradiente de protones a ambos lados de la membrana celular y por tanto se inhibe el NHE, que funciona por dicho gradiente. Otros mecanismos como cambios en los niveles de algunos metabolitos también podrían inhibir al citado sistema. Cuando se produce la reperfusión, los protones son arrastrados del líquido extracelular y se provoca de nuevo, la aparición del gradiente y, por tanto, la activación del NHE, para una acelerada restauración del pH. Así pues, los protones se intercambian por Na^+ , causando un acúmulo intracelular de este ion. Es precisamente esto último lo que activa al intercambiador Na^+/Ca^{2+} , que operando en forma reversa introduce Ca^{2+} en la célula, a expensas de la expulsión de Na^+ al líquido extracelular (Lazdunski *et al.*, 1985). Este aumento de la concentración de Ca^{2+} durante la isquemia y, en mayor medida, durante la reperfusión, se relaciona con el daño celular (Kihara *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Steenbergen *et al.*, 1987, citados por Park *et al.*, 1999). El incremento en la concentración citosólica de calcio activa una serie de procesos claramente deletéreos, generadores de arritmias y de deterioro morfofuncional del miocardio. Precisamente estos hallazgos sentaron las bases para investigar, dentro de la protección miocárdica, los múltiples inhibidores del NHE de los que cabe resaltar al

cariporide y al zoniporide (para revisión ver Such-Miquel, 2005) sin que los efectos beneficiosos en humanos hayan sido claramente demostrados.

Recientemente y dentro del campo de investigación en “Protección miocárdica” se han desarrollado estudios con el fin de evidenciar los efectos beneficiosos, sobre el miocardio isquémico y reperfundido, de actuaciones sobre el metabolismo. Este es el caso de la trimetazidina, sobre la que algunos estudios han evidenciado su efecto cardioprotector facilitando la oxidación de la glucosa en detrimento de la de ácidos grasos (Wu *et al.*, 2018) cuyo catabolismo obliga un consumo mayor de oxígeno. Precisamente en la revisión de Wu *et al.*, (2018) a la trimetazidina también se le atribuye un papel protector del miocardio por su efecto inhibidor de la autofagia excesiva.

Otro enfoque, que sin duda tiene su trasunto en la clínica humana es el preconditionamiento, es decir el efecto protector que ejerce el que la agresión isquémica haya ido precedida de episodios breves de interrupción del flujo coronario (Kloner y Jennings, 2001). En este efecto protector juega un papel importante la apertura de los canales KATP mitocondriales. Éstos además también parecen jugar un importante papel en el llamado post-condicionamiento en el que ciclos repetitivos de reperfusión e isquemia exhiben cierto grado de protección (Jin *et al.*, 2012), aunque los resultados clínicos no han sido concluyentes (Bodi *et al.*, 2014).

La denominada terapia celular forma parte de los nuevos planteamientos relacionados con la protección miocárdica (Silvestre, 2016). No obstante, pese a los avances aportados por la misma, la inducción de la diferenciación de células troncales a cardiomiocitos presenta aún ciertas dificultades y efectos no deseados. Se han demostrado efectos cardiovasculares beneficiosos de los exosomas (Yuan *et al.*, 2018), que pueden transmitir miRNAs, mRNAs y proteínas a células diana y

1. Introducción

promover la proliferación celular, la diferenciación, y la angiogénesis e inhibir la apoptosis y la inflamación (He *et al.*, 2020). Además, se ha demostrado por diferentes autores que la administración de exosomas puede operar favorablemente frente a la fibrosis. Así, se ha señalado que los exosomas derivados de células madre embrionarias además de inducir la formación de nuevos vasos y prolongar la supervivencia de los cardiomiocitos, también son capaces de reducir la fibrosis en el periodo post-infarto (Lazar *et al.*, 2018).

1.2.2.1.2. Inhibidores de las desacetilasas de histonas: nuevas perspectivas

En la actualidad hay cuatro quimiotipos principales de inhibidores de las HDAC en desarrollo clínico: ácidos hidroxámicos, ácidos grasos de cadena corta, tetrapéptidos cíclicos y benzamidas. Todos ellos comparten un patrón de farmacóforo común, el cual consiste en un dominio de unión a zinc, un dominio conector que imita el sustrato y ocupa el canal del sitio activo, una unidad de conexión y una unidad de protección que contacta la superficie de la enzima (Tao *et al.*, 2014). Los inhibidores de las HDAC son moléculas que se unen a estas enzimas interfiriendo o bloqueando sus funciones. Estas moléculas están involucradas en procesos celulares como la regulación de la expresión génica y la apoptosis, a través de la acetilación de proteínas histonas y no histonas (Lyu *et al.*, 2019). En la actualidad el uso de estas moléculas es objeto de estudio ya que se han observado efectos beneficiosos en el tratamiento de varias enfermedades. De hecho, donde más se están estudiando es en el cáncer, debido a la importancia que tiene la regulación génica en este tipo de patología (Xie *et al.*, 2019). Además, se han utilizado en enfermedades parasitarias, inflamatorias o como antiepilépticos. El descubrimiento de la acción hipertrófica de los inhibidores de las HDAC sugirió un potencial terapéutico para estos

compuestos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca humana (McKinsey, 2012). En el área cardiovascular se está estudiando su papel en el tratamiento de arritmias supraventriculares, en el infarto de miocardio, en la remodelación cardíaca, en la hipertensión y en la fibrosis (Tian *et al.*, 2019).

Diversos estudios sugieren que la lesión por isquemia y reperfusión se deriva, al menos en parte, del aumento de la actividad de las HDAC y la posterior desacetilación relativa de histonas y proteínas involucradas en una gran variedad de procesos. Esta relación aumenta la posibilidad de que la inhibición de las HDAC sea un objetivo terapéutico potencialmente significativo en la lesión por isquemia y reperfusión (Xie *et al.*, 2019). Las HDAC participan en el proceso de remodelación de tejidos, por ello se estudia la posibilidad de que los inhibidores de estas enzimas podrían utilizarse para corregir el remodelado patológico y modular la fibrosis cardíaca. Uno de los principales desafíos para controlar el proceso fibrótico inadecuado es actuar sobre el incremento de los miofibroblastos, ya que son las principales células efectoras de la fibrosis. Se ha demostrado que los inhibidores de las HDAC pueden revertir la activación de los miofibroblastos, la hipertrofia miocárdica y preservar la función cardíaca en diferentes modelos animales de insuficiencia e hipertrofia cardíaca (Lyu *et al.*, 2019). La eficacia de estos inhibidores de las desacetilasas de histonas en modelos experimentales de insuficiencia cardíaca probablemente se deba a su capacidad para alterar la acetilación de las histonas y las proteínas no histonas en distintos tipos celulares como miocitos, fibroblastos y células inmunes, entre otros. Esto va a suponer la alteración de diversos mecanismos patológicos, como, por ejemplo, la hipertrofia de cardiomiocitos, la fibrosis y la inflamación que culminan en daño orgánico. Por tanto, se ha señalado la necesidad de utilizar enfoques de biología de

1. Introducción

sistemas para comprender el impacto que tienen las HDAC en el corazón (McKinsey, 2012).

En diversos estudios los inhibidores de las HDAC han demostrado efectos antifibróticos prometedores, posicionándolos como posibles agentes terapéuticos. Como se ha comentado anteriormente, se ha observado que los inhibidores de las desacetilasas de histonas bloquean la fibrosis cardíaca en modelos preclínicos de insuficiencia cardíaca. Sin embargo, no está del todo claro qué isoformas de HDAC juegan un papel clave en los procesos de fibrosis cardíaca, así como los mecanismos que subyacen. Williams *et al.*, (2014) observaron que la inhibición selectiva de las HDAC de clase I tiene una potente acción supresora sobre la fibrosis cardíaca mediada por angiotensina II, actuando sobre dos poblaciones de células efectoras clave, los fibroblastos cardíacos y los fibrocitos derivados de la médula ósea. La inhibición de HDAC de clase I bloquea la progresión del ciclo celular de los fibroblastos cardíacos mediante la desrepresión de los genes que codifican los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDK), p15 y p57. Por otra parte, los inhibidores de HDAC de clase I bloquean la diferenciación dependiente de agonistas de fibrocitos a través de un mecanismo que implica la represión de la señalización de quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2). Estos autores sugieren que un mecanismo por el cual las HDAC de clase I estimulan la fibrosis en el corazón es reprimiendo la expresión de genes antiproliferativos en los fibroblastos cardiacos, resultando en la expansión del conjunto de células productoras de matriz extracelular en el miocardio como respuesta al estrés patológico (Williams *et al.*, 2014).

Las HDAC sirven de nexo para múltiples redes de señalización profibróticas. Diversos estudios han demostrado que los agentes farmacológicos que alteran la acetilación de lisina al actuar sobre las desacetilasas de histonas son capaces de bloquear la fibrosis patológica. En

un estudio realizado con ratones que sobreexpresan la proteína de solo homeodominio (HOPX) observaron que en la hipertrofia cardiaca el inhibidor de las HDAC, Tricostatina A, revierte la fibrosis auricular, el remodelado de la conexina 40 y la vulnerabilidad a arritmias auriculares independientemente de la angiotensina II (Liu *et al.*, 2008). A pesar de estos hallazgos, las bases moleculares de las acciones antifibróticas de los inhibidores de las HDAC no están dilucidadas. Es posible que los inhibidores de las HDAC bloqueen la fibrosis cardiaca a través de múltiples mecanismos como la inhibición de la proliferación y/o la migración de los fibroblastos cardiacos, la activación de genes que suprimen la producción de matriz extracelular por parte de los fibroblastos, la supresión de señales proinflamatorias relacionadas con la fibrosis y el bloqueo de la transición endotelio-mesenquimal (EndoMT) (Schuetze *et al.*, 2014). En un trabajo realizado por este mismo autor, observaron que inhibidores de las HDAC tienen una capacidad notable para bloquear la diferenciación de precursores monocíticos en fibrocitos maduros, productores de colágeno (Schuetze *et al.*, 2014).

Otros autores observaron que los inhibidores de las HDAC tienen efectos directos sobre los fibroblastos cardiacos ya que en estudios *in vitro* con fibroblastos ventriculares de rata, el inhibidor Tricostatina A, bloquea la inducción de la síntesis de colágeno mediada por TGF- β (Kong *et al.*, 2006 citado por Schuetze *et al.*, 2014).

En un estudio en el que se emplea el inhibidor selectivo de HDAC de clase I, Mocetinostat, que atenúa la fibrosis cardiaca y mejora la función cardiaca en un modelo murino de infarto de miocardio. Observaron que, en el miocardio infartado, las enzimas HDAC1 y HDAC2 se regulaban al alza. La inhibición de las HDAC de clase I revirtió la deposición de colágeno intersticial y mejoró la función cardiaca en el modelo de insuficiencia cardiaca congestiva secundaria a un infarto de miocardio. Mocetinostat

1. Introducción

promovió *in vitro* la reversión de la activación de los miofibroblastos. Por tanto, los autores sugieren que, en situaciones de insuficiencia cardíaca avanzada, la inhibición de las HDAC de clase I puede revertir la fibrosis y que la actividad antifibrótica del Mocetinostat incluye la reversión del fenotipo de los miofibroblastos y la regulación de la proliferación celular y apoptosis en fibroblastos cardíacos (Nural-Guvener *et al.*, 2014).

Al igual que este inhibidor, hay otros tipos que han demostrado la capacidad de atenuar la fibrosis cardíaca que se produce tras un daño cardíaco. Es el caso de un estudio realizado en ratas con insuficiencia cardíaca inducida por la administración de isoproterenol, donde el inhibidor MPT0E014 atenúa la expresión de una variedad de proteínas involucradas en la inflamación, en la fibrosis y en el metabolismo energético, sugiriendo por tanto que, las HDAC contribuyen al fenotipo inflamatorio, fibrótico y metabólico que se presenta durante la insuficiencia cardíaca (Bagchi y Weeks, 2019).

Hay diversos estudios en los que se analiza el papel de las HDAC en el desarrollo de la fibrosis. La evidencia acumulativa indica que las HDAC aceleran la fibrogénesis de manera redundante y que las moléculas que actúan como inhibidores de estas enzimas regulan con éxito la fibrosis. En la figura 1.12 se representan de forma esquemática las propiedades antifibróticas que tienen las moléculas inhibidoras de las desacetilasas histonas (Yoon *et al.*, 2019).

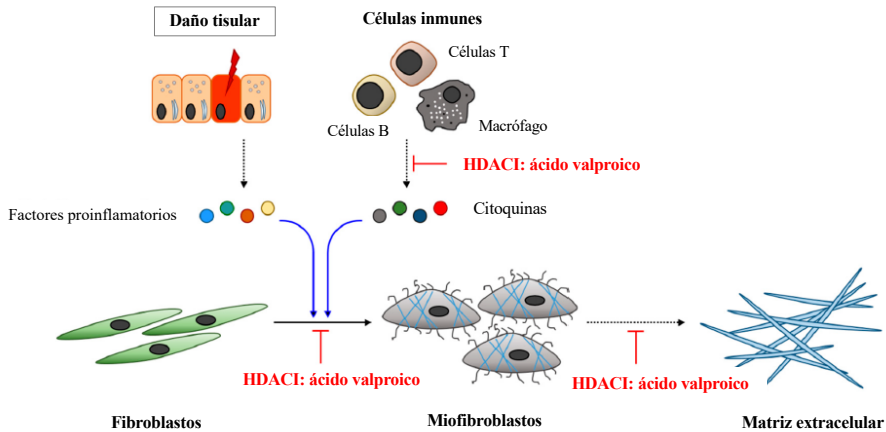


Figura 1.12 Esquema de las propiedades antifibróticas de los inhibidores de las desacetilasas histonas (HDACI) como es el caso del ácido valproico. En la figura la flecha discontinua indica secreción; la flecha azul es estimulación; la flecha negra es diferenciación y la línea roja roma indica inhibición. Figura traducida y modificada de Yoon *et al.* (2019).

1.2.2.1.3. El ácido valproico como agente terapéutico en la protección miocárdica

En el presente trabajo se ha utilizado el ácido valproico como agente inhibidor selectivo de las desacetilasas de histonas de clase I. Se trata de un ácido graso de cadena corta ramificado derivado del ácido valeriánico (ácido pentanoico). Se utiliza principalmente en el tratamiento de la epilepsia como agente anticonvulsivo, pero también se emplea en el tratamiento de las migrañas y de trastornos bipolares, como agente estabilizador del estado de ánimo, ansiedad y trastornos psiquiátricos. Se ha estudiado su uso como agente adyuvante en el cáncer, en la terapia contra el VIH y en las enfermedades neurodegenerativas debido a su acción como agente inhibidor de las desacetilasas histonas (Ghodke-Puranik *et al.*, 2013). En base a su relativa seguridad en humanos, se ha propuesto su utilización en ensayos clínicos sobre insuficiencia cardiaca (McKinsey,

1. Introducción

2012). De hecho, tras estudios epidemiológicos de pacientes que toman este fármaco se sugirió que podía tener efectos protectores en el sistema cardiovascular. Aún así actualmente se desconoce, y por tanto está siendo objeto de estudio, si el ácido valproico mejora la función cardíaca tras el infarto de miocardio, así como cuál es el mecanismo de acción subyacente a estos efectos (Tian *et al.*, 2019).

Como se ha desarrollado anteriormente, las citoquinas proinflamatorias activan a los fibroblastos cardíacos para producir matriz extracelular. Al menos parte de la acción antifibrótica de los inhibidores de las HDAC puede deberse a su acción antiinflamatoria. En un estudio realizado en una cepa de ratas espontáneamente hipertensas que fueron tratadas con ácido valproico durante veinte semanas, se observó una disminución, en el ventrículo izquierdo, de la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , así como la inhibición de la fibrosis cardíaca y una mejora en la función cardíaca (Cardinale *et al.*, 2010 citado por McKinsey, 2012). En un estudio con ratas sometidas a infarto de miocardio y tratadas con ácido valproico observaron que la hipertrofia de los cardiomiocitos y la formación de colágeno en las zonas adyacente y lejana al infarto se atenuaron significativamente; además, la fracción de acortamiento ventricular izquierda fue significativamente mayor en los grupos tratados con el fármaco (Lee *et al.*, 2007). Recientemente en 2019 Tian *et al.*, realizaron un estudio en ratas con infarto de miocardio tratadas con ácido valproico en diferentes tiempos experimentales. En los grupos tratados observaron, entre otros resultados, una reducción del tamaño del infarto y una función sistólica preservada tras el infarto. Además, vieron que el tratamiento a largo plazo mejoró notablemente el rendimiento cardíaco. Por otro lado, el ácido valproico también revirtió significativamente la expresión génica alterada por el infarto relacionada

con el metabolismo de los cardiomiocitos y la respuesta inflamatoria (Tian *et al.*, 2019).

Kang *et al.*, observaron que la inhibición de las HDAC por el ácido valproico atenúa las respuestas inflamatorias, hipertróficas y fibróticas en corazones de ratas espontáneamente hipertensas. Pensaron que la inhibición de las HDAC ejerce estos efectos a través de la acetilación del receptor mineralcorticoide el cual juega un importante papel en las enfermedades cardiovasculares, puesto que, regula la función cardíaca mediante la inducción de inflamación y matriz extracelular, así como la expresión de tenascina-X, inhibidor del activador de plasminógeno-1, orosomucoide-1 y colágeno IV. Observaron en su modelo que el ácido valproico atenúa la hipertrofia y la fibrosis cardíaca a través de la acetilación del receptor mineralcorticoide, reduciendo la expresión, entre otros, de genes diana como la tenascina-X que es un regulador esencial de la deposición de colágeno por los fibroblastos y se encuentra regulada al alza durante los procesos de fibrosis en respuesta a un daño. Por tanto, se considera que el receptor mineralcorticoide es un objetivo potencial para la fibrosis y la hipertrofia (Kang *et al.*, 2015).

Zhang *et al.*, realizaron un estudio en el que observaron que la diferenciación de pericitos cardíacos a miofibroblastos es dependiente de HDAC4 y requiere la fosforilación de ERK. Ésta última es necesaria para la expresión de α -SMA en respuesta a angiotensina II. Por tanto, la inhibición de HDAC4 por el ácido valproico es suficiente para disminuir la fosforilación de ERK y bloquear la expresión de α -SMA estimulada por la angiotensina II. En su estudio demostraron que el ácido valproico atenúa la fibrosis cardíaca en ratas tratadas con angiotensina II, lo cual se caracterizó por una expresión reducida de colágeno tipo I. Además, el ácido valproico fue capaz de inhibir la proliferación, migración y diferenciación de los pericitos en miofibroblastos inducidos por angiotensina II. Esto sugiere que

1. Introducción

los pericitos también podrían emplearse como un nuevo objetivo terapéutico para prevenir la fibrosis (Zhang *et al.*, 2018).

Las desacetilasas de histonas intervienen en el control de los procesos asociados al remodelado, como la hipertrofia, la fibrosis y el metabolismo energético. La inhibición de las HDAC también se ha relacionado con la atenuación de la fibrosis auricular y la reducción de la inducibilidad de episodios arrítmicos auriculares en modelos preclínicos. Scholz *et al.*, estudiaron si el ácido valproico es capaz de atenuar el remodelado auricular en ratones transgénicos, un modelo experimental con un extenso remodelado auricular con progresión dependiente de la edad desde focos auriculares ectópicos a fibrilación auricular paroxística y finalmente de larga duración. Observaron que el ácido valproico redujo la dilatación auricular, el aumento de tamaño de los cardiomiocitos, la fibrosis auricular y la desorganización de la ultraestructura de los cardiomiocitos. Además, también redujo la aparición de trombos auriculares y retrasó la aparición de fibrilación auricular de 4 a 8 semanas (Scholz *et al.*, 2019).

Por todo ello, es objeto de interés el estudio de la inhibición de las enzimas desacetilasas de histonas en el ámbito cardiovascular, puesto que, tienen efectos tanto en los procesos involucrados en la inflamación como en aquellos que intervienen en el desarrollo de la fibrosis cardiaca, haciendo que sean un posible objetivo terapéutico viable en las enfermedades cardiovasculares. Es necesario seguir investigando para esclarecer los fundamentos acerca de los mecanismos de acción de estos inhibidores en el corazón, así como sus efectos en el resto del organismo (Bagchi y Weeks, 2019).

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

Habida cuenta de que:

1.- La reperfusión, tras un tiempo de oclusión arterial coronaria que genera cambios morfofuncionales irreversibles, origina una serie de alteraciones anatomopatológicas en el miocardio ventricular afectado por la privación del flujo sanguíneo, que le conducen a un estadio fibrótico produciéndose, no solamente un remodelado morfológico, sino también un remodelado eléctrico en el que el acoplamiento mecano-eléctrico entre los cardiomiocitos se ve alterado y se deteriora la propagación del impulso eléctrico.

2.- La fibrosis favorece la formación de obstáculos anatómicos a la conducción de la onda de activación eléctrica y aumenta la probabilidad de que se formen circuitos reentrantes y se desencadenen arritmias que amenazan la vida como son las taquicardias y la fibrilación ventricular.

3.- El proceso fibrótico, como otros procesos que entrañan malignidad, parece ligado al nivel de desacetilación de las histonas nucleares y que estudios previos demuestran que las desacetilasas de histonas de clase I promueven la fibrosis mediante la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, entre otros mecanismos.

4.- Las moléculas inhibitoras de las desacetilasas de histonas pueden utilizarse para detener o enlentecer los procesos implicados en las respuestas cardiacas adversas ocurridas en procesos patológicos como el infarto miocárdico.

5.- El ácido valproico (ácido graso de cadena corta), es un fármaco de los cuatro quimiotipos principales inhibidores de las desacetilasas de histonas en desarrollo clínico (ácidos hidroxámicos, ácidos grasos de cadena corta, tetrapéptidos cíclicos y benzamidas) que disminuye la expresión de las

1. Introducción

citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , inhibe la fibrosis cardiaca y mejora la función cardiaca.

Se ha planteado la presente investigación en corazones aislados y portadores de infarto (una hora de oclusión seguida de reperfusión durante seis semanas) con la siguiente hipótesis: La administración de ácido valproico disminuirá la extensión del infarto, las modificaciones de las propiedades electrofisiológicas del miocardio y la inducibilidad de fibrilación ventricular de modo beneficioso.

1.4. Plan de trabajo

Para comprobar la hipótesis se ha planteado el siguiente plan de trabajo:

Desarrollar un modelo de infarto crónico experimental en conejos a los que se les produce un infarto por ligadura coronaria seguida de reperfusión durante seis semanas, al cabo de las cuales se sacrifica al animal y se hace un estudio, en corazón aislado y perfundido, de las propiedades electrofisiológicas del miocardio ventricular y de la inducibilidad de arritmias ventriculares. Finalizado el estudio electrofisiológico se determina mediante tinción el área de riesgo y las zonas de infarto. Todo ello se determina en un grupo “falso operado”, otro control (infarto no tratado) y un tercer grupo tratado con ácido valproico. Finalizadas las determinaciones y obtenidos los correspondientes resultados, se aplica los test de inferencia estadística correspondientes.

Capítulo 2

MATERIAL
Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Animales de experimentación

El presente estudio se ha realizado en 65 conejos blancos Nueva Zelanda macho (*oryctolagus cuniculus*). Al inicio del procedimiento experimental los animales tenían 15 semanas de edad y un peso comprendido entre 3 y 3,5 Kg y Se sacrificaron con 20 semanas de edad y un peso entre 3,7 y 4 Kg.

Los animales fueron adquiridos de la granja San Bernardo S.L. (Navarra-España), empresa registrada como centro de cría y suministro de animales de laboratorio. Éstos se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València, bajo condiciones controladas y constantes de temperatura (temperatura ambiente de $19 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humedad relativa ($55 \pm 10\%$) y ciclos de luz artificial-oscuridad de 12h. Los animales fueron estabulados en *racks* formados por jaulas individuales para conejos, cumpliendo éstas las dimensiones reglamentarias. Además, disponían de enriquecimiento ambiental adaptado a las necesidades individuales y a las propias de la especie. Desde su estabulación y durante todo el protocolo experimental los animales dispusieron de comida (dieta basada en pienso estándar procedente de la granja San Bernardo) y agua *ad libitum*, controlándose diariamente su ingesta.

2. Material y métodos

2.1.2. Fármacos y materiales empleados en el quirófano experimental para la realización del modelo experimental de infarto agudo de miocardio

Fármacos:

- Buprenorfina: Buprenodale® Multidosis/Multidose 0,3 mg/ml (*Dechra Veterinary Products*).
- Meloxicam: Metacam® 5 mg/ml (*Boehringer Ingelheim Animal Health España, S.A.U.*).
- Enrofloxacin: Alsir® 2,5% (*Esteve Veterinaria*).
- Ketamina: Imalgene 1000 100mg/ml viales de 10 ml (*Boehringer Ingelheim Animal Health España, S.A.U.*).
- Xilacina: Xilagesic® 20 mg/ml viales de 25 ml (*©Calier*).
- Propofol: PropoVet® Multidosis 10 mg/ml (*Abbott Laboratories*).
- Isoflurano: IsoFlo® 100% (*Zoetis*).
- Fluidoterapia:
 - Solución salina: Suero fisiológico: FisioVet® NaCl 0,9% de 500 ml (*B. Braun, Rubí, España*).
 - Solución expansora del plasma: Suero Dextranorm Salino 7,5% de 500 ml (*B. Braun*).
 - Solución nutritiva: Suero GlucosaVet® 5g/100ml de 500 ml (*B. Braun*).
- Gel oftálmico, Carbómero 0,2% p/p: Xilin gel (*Nicox*).
- Pentobarbital sódico: Dolethal 200 mg/ml viales de 200 ml (*Vétoquinol*).
- Espray de adhesivo micronizado: Aluminio (polvo micronizado) 250 mg de 200 ml (*Henry Schein*).
- Gel de ultrasonidos (*Henry Schein*).
- Espray y gel de contacto para electrodos (*Henry Schein*).
- Gel de Miel de Manuka (*Henry Schein*).

Materiales:

- Báscula veterinaria *Soehnle* 7858 con plataforma de acero inoxidable.
- Rasuradora eléctrica.
- Soporte de calentamiento eléctrico (manta eléctrica)
- Soporte de ventilación mecánica: Large Animal Volume Controlled Ventilator (dual phase control) de *Harvard apparatus* 230 VAC/50 Hz MA1 55-0723.
- Vaporizador de isoflurano MK-TC-II (*McKinley*).
- Monitor multiparamétrico VetCare de ECG, SpO₂ y PANI (V92XXB) (*B. Braun Vetcare SA, Barcelona, España*).
- Lámpara de infrarrojo de voltaje: AC 220-240V.
- Ecógrafo (*Vivid S5 GE Healthcare*)
- Tubos de recogida de muestra sanguínea: BD Vacutainer SST™ II Advance de 3,5 ml (Ref: 367957) (*BD Vacutainer*).
- Centrífuga refrigerada (*ThermoFisher Scientific*).
- Bombas osmóticas de 2 ml, 10.0 µl/hr. Modelo: 2ML1 (*Alzet® Osmotic Pumps*).
- Fonendoscopio campana doble (*Henry Schein*).
- Termómetro digital especial veterinaria (*Henry Schein*).
- Electrodo de electrocardiograma: Ambu® WhiteSensor 4540M (Ambu).
- Bisturí eléctrico.
- Separador Weitlander romo 13,5 cm (*Henry Schein*).
- Hilos de suturas quirúrgicas:
 - Seda trenzada negra 2/0, 75 cm, HR-26; 8300126 (*Silkam® de B Braun, Cataluña, España*).
 - Monosyn® Violeta Sutura quirúrgica de Gliconato, monofilamento, absorbible de 6/0, 70 cm, HR17; G0022002 (*B. Braun, Cataluña, España*).

2. Material y métodos

Material fungible:

- Palomillas de infusión 21G verde (*Henry Schein*).
- Tubos de extensión para equipos de infusión (*Henry Schein*).
- Llaves de tres vías (*Henry Schein*).
- Tubos endotraqueales de PVC 2,0 mm sin manguito (*Henry Schein*).
- Catéteres intravenosos: Introcán Certo 22G azul (4251318 de *B Braun*).
- Agujas de BD Microlance™ 3, 21G x 1, 0,8 mm x 25 mm; 301156 (*BD*, España).
- Agujas de BD Microlance™ 3, 27G x ½”, 0,4 mm x 13 mm; 300635 (*BD*, España).
- Vendaje tubular (*Henry Schein*).
- Vendaje de gasa elástica (*Henry Schein*).
- Vendas cohesivas (*Henry Schein*).
- Apósito Non Woven con almohadillado (*Henry Schein*).
- Empapadores (*Henry Schein*).
- Paños de campo estériles y absorbentes de doble capa con adhesivo lateral (*Henry Schein*).
- Grapadora cutánea 35W (*Henry Schein*).

Fármaco empleado en el grupo tratado:

Ácido valproico: Valproic acid sodium salt 98% (*Sigma-Aldrich®*). Se diluye en tampón fosfato salino pH 7.2 (*Sigma-Aldrich®*).

2.1.3. Fármacos, reactivos y materiales empleados para la realización del protocolo de electrofisiología cardiaca experimental

Fármacos y reactivos:

- Tiopental sódico: Tiobarbital 1g Braun (*B. Braun*).
- Agua destilada obtenida de un sistema de destilación de agua *Millipore* (Billerica, MA, E.E.U.U).
- Heparina: Heparina sódica 5000 UI/ml (*Laboratorios farmacéuticos ROVI, S.A.*).
- Bala de carbógeno: mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ (*Praxair España S.L.: Nippon Gases España, S.L.U.*).
- Solución de Tyrode:
 - Glucosa: D (+)-Glucosa anhidra (*AppliChem Panreac ITW Companies*).
 - NaH₂CO₃: Carbonato de hidrógeno de sodio (*AppliChem Panreac ITW Companies*).
 - NaCl: Cloruro de sodio (*AppliChem Panreac ITW Companies*).
 - CaCl₂: Cloruro de calcio 2-hidrato (*AppliChem Panreac ITW Companies*).
 - MgCl₂: Cloruro de magnesio hexahidratado (*VWR Chemicals*).
 - KCl: Cloruro de potasio (*AppliChem Panreac ITW Companies*).
 - NaH₂PO₄: Di-hidrogenofosfato de sodio 1-hidrato (*AppliChem Panreac ITW Companies*).

2. Material y métodos

Materiales:

Sistema de estimulación:

- Electrodo bipolar de acero inoxidable colocados sobre la superficie epicárdica del corazón para la estimulación eléctrica miocárdica ventricular. Tienen un diámetro de 0,125 mm y una separación interelectrodo de 1 mm.
- Estimulador *Grass®*, modelo *S88* (*Grass Instruments® Inc., Quincy, MA, EE. UU.*), provisto de una unidad de aislamiento de estímulos (modelo *SIU5*, de la misma firma), y al cual se le conecta un electrodo bipolar de estimulación. El estimulador permite emitir pulsos de corriente y controlar parámetros como la frecuencia de estimulación, el número, la intensidad y la duración de los estímulos.
- Sistema controlado por computación, conectado al estimulador para la emisión de los pulsos de corriente de forma programada.

Sistema de registro:

- Electrodo bipolar de plata clorurada para el registro del auriculograma; con un diámetro de 0,5 mm y una separación entre electrodos de 1 mm.
- Electrodo múltiple de registro colocado sobre la superficie epicárdica del corazón, para el registro de los electrogramas ventriculares. Está formado por 256 electrodos unipolares, de acero inoxidable con un diámetro 0,125 mm y una distancia interelectrodo de 1 mm. Representado en la figura 2.1.



Figura 2.1: Electrodo múltiple de registro ventricular empleado en los experimentos de la presente tesis doctoral. En la imagen se observan los 256 electrodos unipolares que conforman la placa.

- Sistema de cartografía epicárdica de la actividad eléctrica cardiaca (*MapTech®*, *Waalre, Holanda*), utilizado para la adquisición, la digitalización y el procesado de las señales electrográficas ventriculares. Dispone de 256 canales, los electrogramas se amplificaron con una ganancia de 50 a 300, se filtraron eliminando las frecuencias situadas fuera de la banda comprendida entre 1 y 400 Hz y se multiplexaron. La frecuencia de muestreo en cada canal fue de 1 kHz con una resolución de 12 bits. El sistema consta de una etapa de acondicionamiento de señales y digitalización. Los registros obtenidos a lo largo del experimento fueron almacenados en soporte digital en un ordenador con una tarjeta de adquisición de datos y el *software* necesario para su monitorización durante el experimento.

Sistema de perfusión tipo Langendorff:

El sistema de perfusión del corazón empleado en el presente trabajo está formado por un sistema de soporte metabólico tipo Langendorff, una bomba peristáltica (*Cole-Parmer® Instrument co.*) y una bomba circulante de calentamiento (*Neslab® Instrument, inc*), la cual mantiene agua destilada a 40°C circulando por la camisa que rodea al sistema, permitiendo

2. Material y métodos

que la solución de Tyrode (líquido nutricional), sea perfundida a través de la arteria aorta a 37°C, conservándose así la preparación a una temperatura óptima durante el procedimiento experimental. El funcionamiento de la preparación es el siguiente: El líquido nutricional es impulsado desde un depósito exterior, donde se oxigena mediante una bala de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂), hasta la parte más elevada del sistema de Langendorff, por medio de la bomba peristáltica. Antes de llegar al sistema se realiza un filtrado del líquido para evitar el paso de partículas de excesivo tamaño que pudiesen causar una posible obstrucción de los vasos coronarios. Una vez el líquido llega al sistema tubular, se calienta durante su descenso hacia el corazón hasta alcanzar una temperatura de 37°C en la raíz de la aorta. Se trata de una perfusión retrógrada por la aorta hacia el sistema de vasos coronarios: la perfusión cierra la válvula aórtica forzando la circulación del fluido por las arterias coronarias fundamentalmente durante la fase diastólica, igual que en el ciclo cardíaco normal, las cámaras izquierdas del corazón permanecen sin líquido. En la figura 2.2 se muestra la preparación experimental formada por el sistema de perfusión, el sistema Langendorff y los sistemas de estimulación y registro.

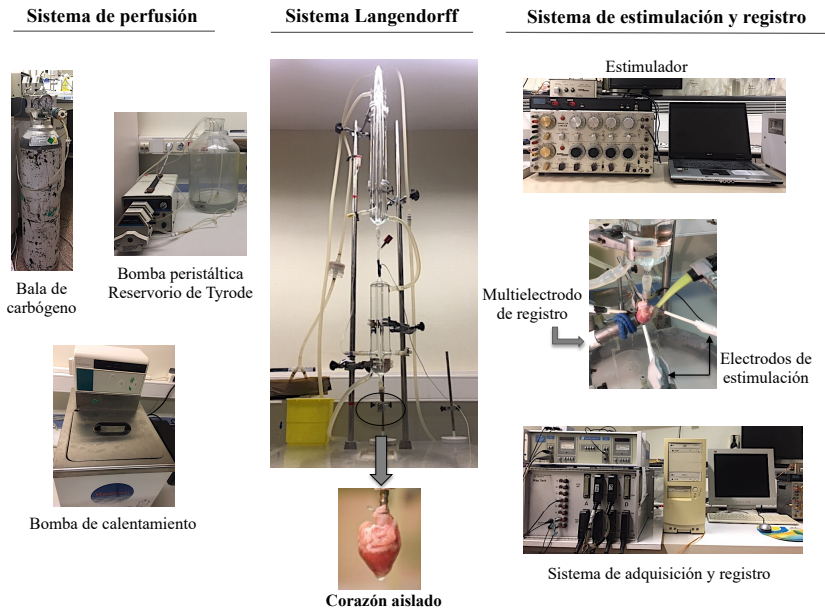


Figura 2.2: Preparación experimental para el modelo de corazón aislado y perfundido de conejo mediante el sistema Langendorff utilizada durante los experimentos realizados para el estudio electrofisiológico en esta Tesis Doctoral.

- Balanza de precisión (*Precisa Gravimetrics*, Dietikon, Suiza).
- Desfibrilador: diseñado en la Universidad Politécnica de Valencia gracias a un proyecto de colaboración con el grupo de bioingeniería del instituto ITACA (BioITACA). El aparato está formado por una unidad de control y dos palas que se conectan a dicha unidad. Las palas se colocan directamente sobre la superficie epicárdica del corazón para aplicar el choque. El dispositivo permite regular la intensidad del choque (0,05- 2,99 J) y el tipo de onda aplicado en la descarga bifásica.
- Filtros: sistema de 3.0 MCE Membrane μm de 47 mm (MF-Millipore).

2. Material y métodos

2.1.4. Reactivos y materiales empleados para la realización del protocolo histológico

Reactivos:

- Tioflavina-S: Thioflavine S (*Sigma-Aldrich*®).
- 2,3,5 Cloruro de trifeniltetrazolio: 2,3,5-Trifeniltetrazolio cloruro (*Merck*).
- Tris-hidroximetil-aminometano: Trizma® base $\geq 99.0\%$ (T) (*Sigma-Aldrich*®).
- Ácido clorhídrico: Hydrochloric acid $\geq 37\%$ fumante (*Sigma-Aldrich*®).
- Formaldehído 4% solución acuosa tamponado (VWR Chemicals, BDH Prolabo).

Materiales:

- Bomba de infusión para jeringa P4000 (*IVAC CareFusion, Rolle, Suiza*).
- Dispositivo formado por 7 cuchillas separadas entre sí por 3 mm diseñado para efectuar los cortes transversales de la pieza anatómica.
- Cámara fotográfica Nikon D5100 18-55II Kit (*Nikon*).

2.1.5. “Software”

En la fase de adquisición de las señales eléctricas durante los estudios electrofisiológicos, así como en el posterior procesado y análisis de los datos obtenidos, se distinguieron dos entornos de trabajo. Por una parte, el *software PaceMap*® (*Waalre, Holanda*) (figura 2.3), incorporado en el sistema de adquisición *MapTech* y, por otra parte, el *software MatLab* (*Mathworks Inc. Natick, MA, E.E.U.U.*). Se desarrollaron los códigos necesarios para extraer la información de los registros.

- PaceMap® es el *software* del sistema de cartografía de la actividad eléctrica cardiaca empleado para la visualización, captura y análisis de los electrogramas en los experimentos. Éste funciona bajo el sistema operativo *Windows (Microsoft)* y realiza la función de configuración de la adquisición, permitiendo así el control del registro, edición del mismo etc. Este *software* almacena los registros en el disco duro del ordenador. Una vez extraídos y almacenados, permite la visualización canal a canal, así como la realización de las operaciones necesarias relacionadas con la cartografía de la actividad eléctrica cardiaca y la identificación de los instantes de activación local en los electrogramas. Para ello es necesario definir y proporcionar previamente al programa las matrices de correspondencia electrodo-canal que codificarán la distribución espacial de las señales (Figura 2.3).

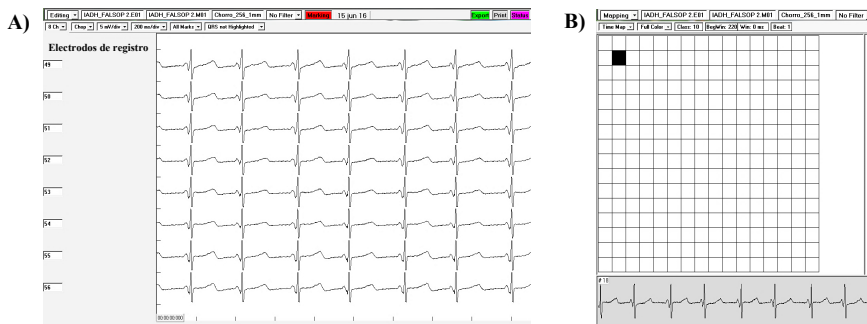


Figura 2.3: Detalle del programa *Pacemap* con un registro en ritmo sinusal. **A)** Pantalla en la que se pueden observar los electrogramas correspondientes a 8 electrodos ventriculares. **B)** Matriz de correspondencia electrodo-canal del electrodo múltiple: cada una de las celdas corresponde a cada uno de los 256 electrodos de la matriz; en la parte inferior de la pantalla se observa el electrograma correspondiente al electrodo seleccionado (celda negra).

- Software *MatLab® R2015b* proporciona un entorno de desarrollo integrado con un lenguaje de programación propio, sobre el que se ha programado diversas aplicaciones para el tratamiento de los datos del presente estudio (figura 2.4).

2. Material y métodos

- *MedMap v2.1*, se trata de una aplicación desarrollada bajo el entorno de trabajo *MatLab®*, empleada para la comprobación y validación de mapas y espectros de frecuencia de las señales de fibrilación ventricular. Se le ha dotado de la capacidad de importar los archivos generados por el programa *PaceMap®*, automatizando así el cálculo de las frecuencias dominantes de los espectros y optimizando el cálculo estadístico por matrices de electrodos.

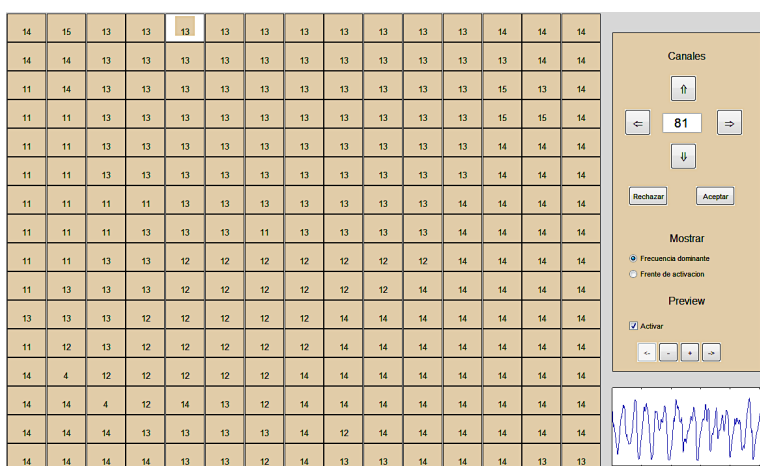


Figura 2.4: Detalle del programa *Matlab®* donde se muestra un ejemplo de la matriz multielectrodo con las distintas frecuencias dominantes analizadas en cada uno de los electrodos.

- “*Marcar Z*”, programa diseñado para obtener los datos de los ficheros de los intervalos entre activaciones ventriculares consecutivas (intervalos V-V) durante la fibrilación ventricular. El programa permite identificar la máxima derivada negativa en los electrogramas de los trazados fibrilatorios correspondientes a los registros obtenidos con el electrodo múltiple (figura 2.5).

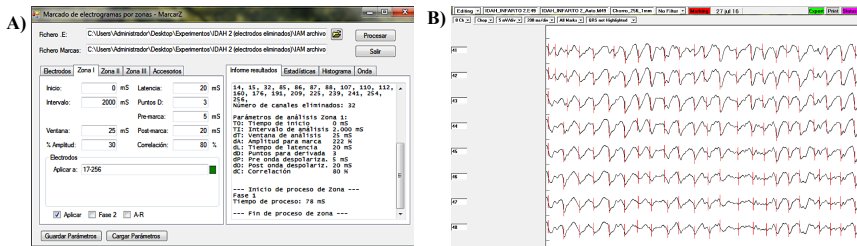


Figura 2.5: A) Ejemplo del programa *Marcar Z* con un archivo cargado y procesado. B) Ejemplo de la visualización en el programa *Pacemap* de las marcas de activación (líneas en color rojo) en los distintos registros ventriculares del archivo cargado anteriormente (figura A) una vez ha sido procesado.

- “*Estadísticas M*”: su función es, una vez generado el fichero de marcas por el programa *Marcar Z* sobre el soporte de *PaceMap*[®], tomar los datos y generar un archivo Excel con los valores descriptivos estadísticos como la media, mediana, desviación estándar y valores de los percentiles para su posterior análisis (figura 2.6).

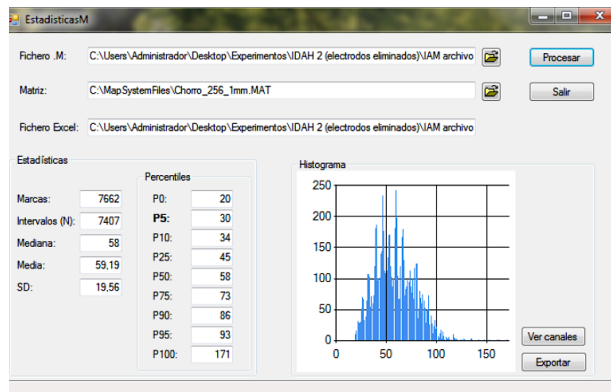


Figura 2.6: Ejemplo de un archivo cargado y procesado en el programa *Estadísticas M*, utilizado para el análisis de distintos parámetros electrofisiológicos.

- SPSS[®] 26.0, paquete estadístico empleado para la gestión de datos y el análisis estadístico de los resultados (*IBM*, Armonk, NY, EE.UU.)
- Paquete de software MATLAB 8.4 (*The MathWorks, Inc.*, Natick, MA, EE. UU.).

2. Material y métodos

2.2. Métodos

2.2.1. Grupos experimentales

Los animales se distribuyeron en 3 grupos experimentales: grupo falso operado (FO) (n=20), grupo control (infarto de miocardio: IM) (n=31) y grupo tratado con el inhibidor de las desacetilasas de histonas, ácido valproico (AV) (n=14). El procedimiento experimental se realizó bajo las mismas condiciones experimentales en los tres grupos. En los grupos IM y AV se indujo el infarto de miocardio, a diferencia del grupo falso operado en el cual sólo se realizó la intervención quirúrgica y en el grupo AV se llevó a cabo el protocolo de administración del fármaco estudiado. Tras el procedimiento quirúrgico se aplicó en todos los casos experimentales el protocolo de cuidados postoperatorios que se describe más adelante. Tras 5 semanas de estabulación se procedió al sacrificio de los animales para la realización del protocolo electrofisiológico, seguido del protocolo histológico. En la tabla 2.1 se resumen los distintos grupos de trabajo.

Grupo experimental	n	Intervención quirúrgica	IM	Tratamiento	Período de estabulación
Falso operado	20	✓	×	×	5 semanas
Control	31	✓	✓	×	5 semanas
Tratado con AV	14	✓	✓	✓	5 semanas

Tabla 2.1: Descripción de los grupos experimentales llevados a cabo en el presente trabajo. La n hace referencia al número total de animales empleados en el presente trabajo. IM: infarto de miocardio; AV: ácido valproico.

2.2.2. Metodología para el desarrollo del modelo experimental de infarto agudo de miocardio en conejos

Tras la estabulación y cuidados iniciales se aplicaron los procedimientos encaminados a la inducción del infarto agudo de miocardio y tras ello se aplicó un protocolo de cuidados postoperatorios, hasta la realización del estudio electrofisiológico una vez transcurridas cinco semanas desde la inducción del infarto. El protocolo de cuidados postoperatorios se diseñó específicamente para este modelo experimental y se distinguieron dos fases: cuidados postoperatorios durante la primera semana y cuidados, supervisión y mantenimiento de los animales hasta completar las cinco semanas tras la inducción del infarto de miocardio. Finalmente, en la sexta semana se procedió al sacrificio de los animales para la posterior realización del protocolo electrofisiológico en el corazón aislado y perfundido con un sistema tipo Langendorff. Tras ello se realizó el protocolo histológico para el estudio macroscópico del tamaño del infarto. Los animales dispusieron de un periodo de aclimatación al medio de 15 días, tras el que se inició el procedimiento experimental. El modelo experimental de infarto agudo de miocardio puesto a punto está dividido en tres fases: prequirúrgica, quirúrgica y postquirúrgica (figura 2.7)

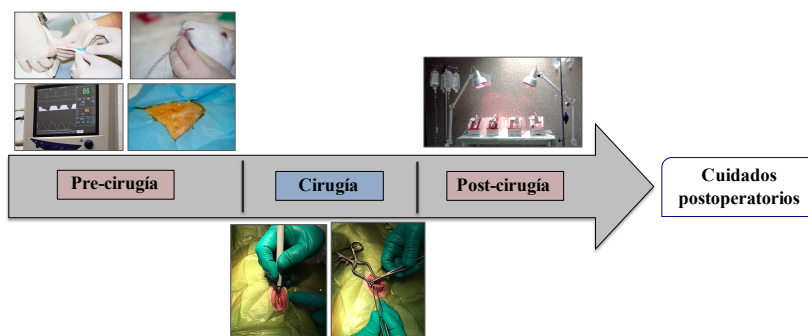


Figura 2.7: Esquema de las etapas de trabajo que forman el procedimiento experimental quirúrgico desarrollado en el presente estudio.

2. Material y métodos

2.2.2.1. Fase prequirúrgica

En primer lugar, los animales fueron medicados por vía subcutánea con un tratamiento analgésico y uno profiláctico formados por un fármaco opioide, un antiinflamatorio no esteroideo, y un antibiótico respectivamente. Las dosis y la posología fueron: buprenorfina (0'03 mg/Kg/6h), meloxicam (0'2 mg/Kg/24h) y enrofloxacino (10 mg/Kg/24h). Después se les administró por vía subcutánea un agente anestésico y analgésico (ketamina 35 mg/Kg) y un agente sedante, miorelajante y analgésico (xilacina 5 mg/Kg). Previamente a la administración de dichos fármacos los animales fueron pesados para el ajuste de las dosis. En todos los animales se habilitó una vía intravenosa periférica en la vena marginal de cada una de las orejas. Una de las vías se utilizó tanto para la administración de medicamentos como de líquidos para compensar las pérdidas durante la intervención quirúrgica. La otra vía se empleó para la extracción de muestras de sangre.

La inducción anestésica se llevó a cabo mediante la administración de un “bolo” de propofol (10 mg/Kg por vía intravenosa) y para el mantenimiento de la anestesia durante la fase prequirúrgica, se administraron “bolos” repetidos. Una vez el animal estuvo sedado se procedió al rasurado del tórax con una rasuradora eléctrica. A continuación, se inició la intubación endotraqueal del animal, y se recurrió a un sistema de respiración controlada con presión positiva. Se realizó una intubación “a ciegas” ya que, debido a la anatomía del conejo la boca de estos animales no se abre ampliamente, poseen una lengua de gran que ocupa la mayor parte de la nasofaringe y oculta a la vista la laringe. Además, la vía aérea es estrecha, larga y sinuosa, tienen unos incisivos grandes y una mandíbula con movilidad restringida que dificulta el reconocimiento de la glotis (Varga, 2013; Fujita *et al.*, 2004).

El animal fue colocado en decúbito prono con el cuello hiperextendido quedando así una línea recta desde la boca hasta la laringe. Se introdujo por la boca un tubo endotraqueal de polietileno transparente sin manguito. El tubo se fue desplazando lentamente hasta llegar a la entrada de la laringe, situación que se precisó al percibir un aumento de la intensidad de los sonidos respiratorios. Se continuó introduciendo el tubo lentamente y se finalizó el avance hasta la tráquea. Una vez intubado, se conectó al soporte de ventilación mecánica volumétrica empleado para asistir a la función respiratoria durante el procedimiento experimental. La anestesia se mantuvo por vía inhalatoria con isoflurano a 1'5-2% de concentración alveolar mínima (CAM).

El animal fue colocado en decúbito supino en la mesa quirúrgica con extensión de miembros superiores e inferiores que se fijaron con ligaduras a la mesa. Una vez posicionado, se cubrió con un paño quirúrgico exponiendo solo la zona a intervenir que se desinfectó con povidona yodada al 10%. Durante el procedimiento quirúrgico se realizó una monitorización multiparámetrica no invasiva que permitió la visualización en tiempo real del electrocardiograma de tres derivaciones, frecuencia cardiaca, presión arterial no invasiva en miembro inferior, pulsioximetría en la lengua, capnografía (frecuencia respiratoria y dióxido de carbono) y temperatura corporal. Durante la cirugía se mantuvo la temperatura corporal de los animales mediante una unidad de calentamiento tipo manta térmica.

2.2.2.2. Fase quirúrgica

El procedimiento quirúrgico empleado para la inducción del infarto agudo de miocardio se inició con la realización de una esternotomía media. Para ello, se llevó a cabo una incisión centrotorácica longitudinal desde el manubrio hasta el cartílago xifoides. Mediante la utilización de electrobisturí y electrocauterio se profundizó hasta alcanzar la cara anterior

2. Material y métodos

del esternón. A continuación, se realizó una disección roma entre el borde caudal del cartílago de la VIII costilla y el proceso xifoides inferior y mediante disección digital se elaboró un túnel subesternal. Tras ello, con una tijera de mayo se procedió a la esternotomía a través del túnel subesternal. Para la exposición del corazón se colocó en primer lugar un separador autoestático y a continuación se realizó una pericardiotomía. Una vez expuesto, con el objetivo de visualizar la arteria coronaria circunfleja izquierda, se colocó un punto quirúrgico sin anudar en el ápex utilizando una sutura monofilamento reabsorbible sintética de 6-0. Esta permitió traccionar el corazón suavemente.

Una vez ubicada la arteria se realizó la transfixión del miocardio con una sutura monofilamento reabsorbible sintética de 2-0 en el primer tercio de su recorrido. A continuación, se llevó a cabo la oclusión coronaria mediante la colocación de un cabo de seda trenzada de 5 mm sobre la arteria, realizando a continuación la ligadura sobre la misma. La oclusión se mantuvo durante una hora. En la figura 2.8 se puede observar un esquema que muestra la posición de la oclusión coronaria realizada. Se confirmó que la oclusión coronaria se había producido con éxito mediante la observación de una elevación del segmento ST en el monitor de constantes vitales, así como la visualización de un cambio de coloración a un aspecto cianótico con abombamiento y acinesia de la pared ventricular en la zona ocluida. Transcurrido el tiempo de oclusión se procedió a la reperfusión coronaria mediante la retirada de la ligadura. En el grupo de los falsos operados, el procedimiento fue similar exceptuando la realización de la ligadura coronaria.

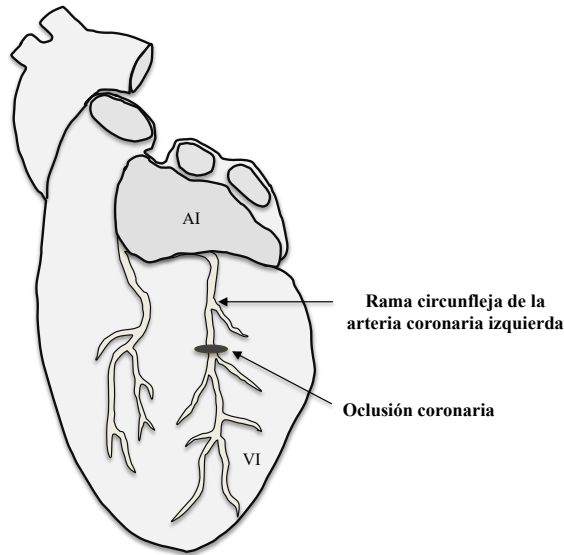


Figura 2.8: Esquema que muestra la posición de la oclusión coronaria en la arteria coronaria circunfleja. Se observa el ventrículo izquierdo (VI), la aurícula izquierda (AI) y la rama circunfleja de la arteria izquierda con la correspondiente oclusión coronaria.

A continuación, se inició el cierre de la esternotomía por planos. En primer lugar, se colocó un drenaje torácico, para ello se efectuó una incisión en el IV espacio intercostal, se avanzó el tubo de drenaje por el tejido subcutáneo hasta la cavidad, se fijó a la piel mediante una sutura monofilamento reabsorbible de 3-0 en bolsa de tabaco y se conectó a una cámara de sellado bajo agua. Tras esto, se fijaron los bordes del esternón mediante una sutura monofilamento reabsorbible de 3-0 en forma de ocho entre las costillas de un lado y las del otro. La capa muscular se cerró mediante sutura discontinua de punto simple usando una sutura monofilamento reabsorbible de 3-0. Finalmente se realizó el cierre de los planos subcutáneo y cutáneo con suturas continuas de monofilamento reabsorbible de 3-0. Para reforzar la sutura cutánea se colocaron grapas. Después se cubrió la herida con un apósito autoadherente. Tras insuflar el pulmón se retiró el drenaje con un movimiento rápido e inmediatamente se cerró la sutura en bolsa de tabaco.

2. Material y métodos

Extracción de muestras sanguíneas

Durante la cirugía se extrajeron muestras sanguíneas para la confirmación de la presencia de infarto mediante el análisis, en suero sanguíneo, del marcador bioquímico de necrosis miocárdica: troponina cardíaca T (TnT). Las muestras se extrajeron de la vena marginal de la oreja en tres instantes temporales. En los grupos control y tratado se obtuvo la primera muestra una vez realizada la transfixión de la arteria coronaria y antes de llevar a cabo la oclusión coronaria. Una vez iniciada la reperfusión se obtuvieron la segunda muestra a los 5 minutos y la tercera a la hora. En el grupo falso operado se extrajeron las muestras en los mismos instantes temporales. Una vez extraídas se almacenaron en un tubo con gel separador y se conservaron refrigeradas (entre 4 y 8 °C) hasta su centrifugación que se efectuó durante 15 minutos a una velocidad de 1500 G y a una temperatura de 4°C. Tras ello, se recogió el suero sanguíneo y se almacenó a -80° C hasta su utilización.

2.2.2.3. Fase postquirúrgica

Esta fase se inició con el protocolo de despertar del animal. En primer lugar, se llevó a cabo la reversión anestésica mediante la interrupción de la administración de la anestesia inhalatoria con isoflurano. Para la retirada del soporte de ventilación mecánica, se comprobó la recuperación de reflejos y el reinicio de la respiración espontánea. Una vez retirado, se mantuvo la administración de oxígeno mediante mascarilla facial. Sólo se procedió a la extubación del animal cuando se comprobó una correcta mecánica ventilatoria. Durante esta fase se mantuvo la temperatura corporal mediante una fuente de calor con luz infrarroja (275 W). Una vez estabilizada la situación los animales fueron estabulados de forma individual.

Protocolo de cuidados postoperatorios

Durante esta fase se diseñó un protocolo específico para este modelo experimental, con el objetivo de asegurar el bienestar animal y facilitar la supervivencia. Este protocolo varía a medida que transcurre el tiempo desde la intervención.

Semana 1:

Tras la cirugía, una vez estabilizados se mantuvo la temperatura corporal mediante una fuente de calor con luz infrarroja (275W) que se mantuvo durante 96 horas. Durante esta primera semana se les administró por vía subcutánea tratamiento analgésico (buprenorfina 0'03 mg/Kg), antibiótico (enrofloxacino 10 mg/Kg) y antiinflamatorio (meloxicam 0'2 mg/Kg). Respecto a la analgesia, en el cuarto día se les implantó de forma subcutánea una bomba osmótica de liberación continua y controlada a una velocidad de 10 μ l/h, para la administración de buprenorfina. Durante los tres primeros días, para compensar la inapetencia que presentan los animales recién operados, se pautó una fluidoterapia por vía intravenosa, habilitada en la vena marginal de la oreja, con una solución glucosada al 5% que se administró a 42 ml/h durante 2h/día. Diariamente se les controlaron parámetros clínicos mediante un examen físico en el que se observaban la condición corporal general, la actitud, la postura y el nivel de ansiedad. Cuando fue necesario se llevó a cabo una auscultación pulmonar y cardíaca. Se controló la ingesta diaria y la funcionalidad digestiva de los animales mediante la observación de la cantidad de heces diaria. Se revisó el estado de la herida quirúrgica y se realizaron las correspondientes curas. En la tabla 2.2 se muestra un esquema del protocolo de trabajo seguido durante la primera semana tras la cirugía.

2. Material y métodos

Semana 1					
Protocolo de cuidados postoperatorios	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	
	Procedimiento quirúrgico	Mantenimiento de la temperatura con luz infrarroja	Mantenimiento de la temperatura con luz infrarroja	Mantenimiento de la temperatura con luz infrarroja	Mantenimiento de la temperatura con luz infrarroja
		Fluidoterapia (IV)	Fluidoterapia (IV)	Fluidoterapia (IV)	Fluidoterapia (IV)
		Tto. analgésico(SC) 0'03 mg/Kg/6h	Tto. analgésico(SC) 0'03 mg/Kg/6h	Tto. analgésico(SC) 0'03 mg/Kg/6h	Tto. analgésico(SC) 0'03 mg/Kg/6h
		Tto. antiinflamatorio(SC) 0'2 mg/Kg/24h	Tto. antiinflamatorio(SC) 0'2 mg/Kg/24h	Tto. antiinflamatorio(SC) 0'2 mg/Kg/24h	Tto. antiinflamatorio(SC) 0'2 mg/Kg/24h
		Tto. antibiótico(SC) 10 mg/Kg/24h	Tto. antibiótico(SC) 10 mg/Kg/24h	Tto. antibiótico(SC) 10 mg/Kg/24h	Tto. antibiótico(SC) 10 mg/Kg/24h
		Control de la funcionalidad digestiva	Control de la funcionalidad digestiva	Control de la funcionalidad digestiva	Control de la funcionalidad digestiva
	Exámen físico general	Exámen físico general	Exámen físico general	Exámen físico general	
	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	
	Mantenimiento de la temperatura con luz infrarroja	-	-	-	
Tto. Analgésico (bomba osmótica) 0'03 mg/Kg/6h velocidad de 10 µl/h	Tto. Analgésico (bomba osmótica) 0'03 mg/Kg/6h velocidad de 10 µl/h	Tto. Analgésico (bomba osmótica) 0'03 mg/Kg/6h velocidad de 10 µl/h	Tto. Analgésico (bomba osmótica) 0'03 mg/Kg/6h velocidad de 10 µl/h		
Tto. antiinflamatorio(SC) 0'2 mg/Kg/24h	Tto. antiinflamatorio(SC) 0'2 mg/Kg/24h	Tto. antiinflamatorio(SC) 0'2 mg/Kg/24h	Tto. antiinflamatorio(SC) 0'2 mg/Kg/24h		
Tto. antibiótico(SC) 10 mg/Kg/24h	Tto. antibiótico(SC) 10 mg/Kg/24h	Tto. antibiótico(SC) 10 mg/Kg/24h	Tto. antibiótico(SC) 10 mg/Kg/24h		
Control de la funcionalidad digestiva	Control de la funcionalidad digestiva	Control de la funcionalidad digestiva	Control de la funcionalidad digestiva		
Exámen físico general	Exámen físico general	Exámen físico general	Exámen físico general		

Tabla 2.2: Resumen del protocolo de cuidados postoperatorios que se lleva a cabo durante la primera semana en el modelo experimental crónico de infarto agudo de miocardio en todos los grupos experimentales. Abreviaturas: Tto: tratamiento.

Semanas 2, 3, 4 y 5:

Con el objetivo de detectar si los animales padecían algún tipo de dolor, estrés o sufrimiento intensos durante el periodo de estabulación y en ese caso aplicar las medidas correctoras adecuadas, diariamente se controló la ingesta y la funcionalidad digestiva, se analizó su aspecto general (acicalamiento, presencia de secreciones y postura), su comportamiento tanto espontáneo como en respuesta a la manipulación. Se controló el proceso de cicatrización de la herida realizando las correspondientes curas. Además, en caso necesario se analizaron variables clínicas como la temperatura corporal o la saturación de oxígeno y se realizó una auscultación pulmonar y cardiaca.

Tras las cinco semanas del protocolo experimental, sobrevivieron 47 conejos (15 en el grupo falso operado, 22 en el grupo control y 10 en el grupo tratado). Esto resultó en una tasa de supervivencia del 72,3% (75% en el grupo falso operado, 70,9% en el grupo control y 71,4% en el grupo tratado). Las causas de muerte se debieron a complicaciones quirúrgicas intraoperatorias y/o postoperatorias.

Aquellos animales que durante las 5 semanas del procedimiento experimental presentaron signos de sufrimiento, dolor o estrés no controlados, con alteración del bienestar animal, fueron sacrificados siguiendo unos criterios establecidos y bajo supervisión del veterinario responsable del centro.

2.2.2.4. Estudio ecocardiográfico

En la segunda y quinta semana tras la cirugía se realizó un control ecocardiográfico de los tres grupos experimentales. El protocolo llevado a cabo fue el siguiente: en primer lugar, se indujo la anestesia del animal con propofol (10mg/Kg) por vía intravenosa, habilitada en la vena marginal de la oreja. A continuación, el mantenimiento anestésico se llevó a cabo por vía inhalatoria mediante mascarilla facial con isoflurano 1'5-2% de concentración alveolar mínima. Una vez anestesiado, se rasuró la parte izquierda del pecho para la realización de la ecocardiografía. Las ecocardiografías se llevaron a cabo utilizando un ecógrafo *Vivid S5 GE Healthcare* y una sonda de 10 MHz. Con el animal en decúbito supino se obtuvieron imágenes en modo M y 2D y con la técnica Doppler. Tras la finalización del procedimiento se llevó a cabo el despertar del animal mediante la reversión anestésica, procediéndose posteriormente a su estabulación.

2. Material y métodos

Los parámetros analizados han sido:

- **DdVI:** Diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo.
- **DsVI:** Diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo.
- **FEVI:** Fracción de eyección ventricular izquierda.
- **Diam. AO:** Diámetro de la raíz aórtica.
- **Diam. AI:** Diámetro auricular izquierdo.

Asimismo, se ha evaluado la competencia de las válvulas y la presencia de derrame pericárdico.

2.2.2.5. Administración del ácido valproico en el grupo tratado

La dosis y posología del fármaco es 500 mg/kg cada 24h. Para su administración los animales se pesaron diariamente con el fin de ajustar la dosis. El fármaco se diluyó en tampón fosfato salino (50 mg/ml) y se administró por vía subcutánea. En la administración se tuvo en cuenta el volumen máximo de inyección por vía subcutánea en el conejo que es de 10 ml/Kg. La administración del fármaco se inició en la fase preoperatoria y se mantuvo diariamente durante las cinco semanas hasta el día del sacrificio.

2.2.3. Estudio electrofisiológico

2.2.3.1. Aislamiento y perfusión del corazón

Una vez transcurridas las 5 semanas desde la inducción del infarto, se procedió al aislamiento, extracción y perfusión del corazón tras sacrificar al animal mediante la administración intravenosa de tiopental sódico (60 mg/Kg). Simultáneamente se administró también por la vena marginal de la oreja heparina sódica 5000 UI/ml (0,1 ml). Para la extracción del corazón se efectuó una toracotomía medioesternal y una pericardiotomía y tras

seccionar el pedículo vascular se sumergió rápidamente en una solución de Tyrode a baja temperatura ($1-5^{\circ}\text{C}$) para su posterior manipulación, evitando así un posible deterioro metabólico del tejido cardíaco. A continuación, se identificaron la arteria pulmonar y la aorta ascendente y se conectó esta última al sistema de Langendorff, fijándola con un hilo de seda de 1-2 mm de diámetro. Una vez ubicado se inició la perfusión del corazón con la solución de Tyrode a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ cuya composición milimolar (mM) es la siguiente: NaCl 130; KCl 4,7; CaCl_2 2,2; Mg Cl_2 0,6; NaH_2PO_4 24,2; y glucosa 12. El pH se mantuvo a 7,4. La oxigenación y soporte de pH de la solución de Tyrode se efectuó con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2). Finalmente, la presión de perfusión inicial se fijó en 60 mmHg. Una vez ubicado el corazón en el sistema de Langendorff, se eliminaron los restos de los demás tejidos (pulmón, restos de pericardio, etc.), y se realizó una pequeña sección en la aurícula izquierda que permitió acceder a las cuerdas tendinosas de la válvula mitral para seccionarlas con el objetivo de hacer insuficiente dicha válvula permitiendo, en su caso, el escape de líquido por la aurícula izquierda. Gracias a este procedimiento se evitaron posibles acumulaciones de Tyrode en el ventrículo izquierdo, en el caso de que la válvula aórtica mostrara cierta insuficiencia, impidiendo así la sobrecarga ventricular.

2.2.3.2. Disposición de electrodos para el protocolo electrofisiológico

Tras la ubicación y adecuación del corazón en el sistema de perfusión, se procedió a la colocación de los distintos electrodos de estimulación y registro de la actividad eléctrica cardíaca mostrados en la figura 2.9. Para el registro del electrograma auricular se ubicó un electrodo bipolar en el haz interauricular de Bachman y para el registro ventricular se utilizó un electrodo múltiple de registro con 256 electrodos unipolares de acero inoxidable, ubicado en la superficie epicárdica de la pared

2. Material y métodos

anterolateral del ventrículo izquierdo. Para a la estimulación ventricular se utilizaron 4 electrodos epicárdicos bipolares situados alrededor de la zona infartada en el ventrículo izquierdo, como se muestra en la figura 2.9. Se estipularon cuatro zonas de estimulación denominadas: apical izquierda (AI), apical derecha (AD), basal derecha (BD) y basal izquierda (BI). En ellas se realizó el test del extraestímulo para la determinación de los periodos refractarios ventriculares. La inducción de la fibrilación ventricular se efectuó mediante estimulación a frecuencias crecientes en la zona BD. El electrodo indiferente se ubicó sobre la aorta canulada.

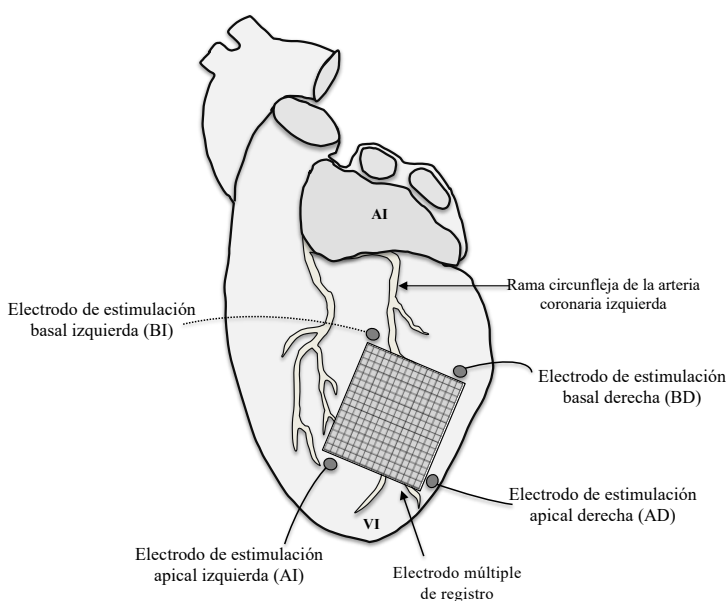


Figura 2.9: Esquema de la ubicación de los distintos electrodos de estimulación ventricular (AI; AD; BI; BD) alrededor de la zona infartada donde está ubicado el electrodo múltiple de registro. Abreviaturas: AI: aurícula izquierda; VI: ventrículo izquierdo.

2.2.4. Determinación de los parámetros electrofisiológicos

En todos los grupos experimentales se determinaron los siguientes parámetros electrofisiológicos.

2.2.4.1. Parámetros de refractariedad

La refractariedad hace referencia a una propiedad relacionada con un hecho característico de las células excitables consistente en que una vez excitada la célula tras la aplicación de un estímulo ésta no puede volverse a excitar durante un tiempo inmediatamente posterior a la aplicación del estímulo.

Se determinó la refractariedad del miocardio ventricular mediante la aplicación del test del extraestímulo ventricular (TEEV), asimismo durante la fibrilación ventricular (FV) se efectuó una estimación de la refractariedad ventricular a partir del análisis de las señales fibrilatorias. A diferencia del TEEV, realizado durante ritmo sinusal y en el que el periodo refractario efectivo estrictamente corresponde a los puntos de aplicación de los electrodos de estimulación, la determinación de la refractariedad durante la FV da una información más global de esta propiedad, habida cuenta de que se realiza el análisis de la arritmia en todos y cada uno de los electrodos de la placa multielectrodo, además de que excluye la estimulación eléctrica para su determinación. La determinación de este parámetro durante la fibrilación ventricular aporta información acerca de la capacidad del tejido miocárdico ventricular para permitir el paso de frentes de activación sucesivos cuando el tejido no se halla en periodo refractario.

2.2.4.1.1. Determinación de los parámetros electrofisiológicos de refractariedad a partir del test del extraestímulo ventricular

El TEEV se utilizó para determinar los periodos refractarios efectivo y funcional. Consiste en la aplicación de un tren base de estímulos a una frecuencia fija y de extraestímulos cuyo intervalo de acoplamiento se va acortando periódicamente hasta conseguir que dicho extraestímulo deje de originar una respuesta ventricular. Los extraestímulos se aplican cada 10 estímulos del tren base como se observa en los registros de la figura 2.10.

2. Material y métodos

Cada estímulo (St) se identifica por su correspondiente artefacto o espícula y a éste le sucede la despolarización que da lugar al correspondiente electrograma ventricular (V).

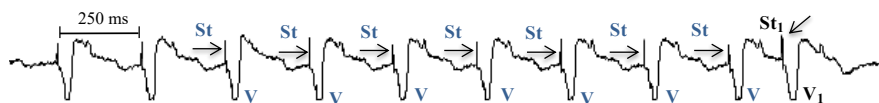


Figura 2.10: Electrogramas ventriculares registrado en un experimento durante el test del extraestímulo ventricular. St se corresponde con los estímulos consecutivos del tren base; V hace referencia a la respuesta ventricular provocada por el estímulo; St₁ se corresponde con el extraestímulo y V₁ hace referencia a la respuesta ventricular producida por este extraestímulo. El ciclo base de este tren es de 250 milisegundos.

En el momento en el que el extraestímulo coincide con el periodo refractario efectivo, deja de aparecer la respuesta ventricular (figura 2.11). Se define al periodo refractario efectivo (PRE) como el máximo intervalo de acoplamiento del extraestímulo ventricular (St-St₁) sin captura ventricular (St₁ sin V₁).



Figura 2.11: Electrogramas ventriculares registrados en un experimento durante la aplicación del test del extraestímulo ventricular. **A)** Se observa cómo el extraestímulo (St₁) se acopla con un ciclo menor que el tren base de estimulación. **B)** Corresponde al tren de estimulación que sigue al presentado en A, en el que el acoplamiento del extraestímulo ya no genera respuesta ventricular ya que se ha alcanzado el periodo refractario efectivo.

En cuanto al periodo refractario funcional (PRF) se define como el mínimo intervalo entre el electrograma ventricular o respuesta ventricular producido por el último estímulo del tren base ventricular y el desencadenado con el extraestímulo (mínimo intervalo V-V₁). En la figura 2.12 se observa un ejemplo de ambos periodos refractarios.

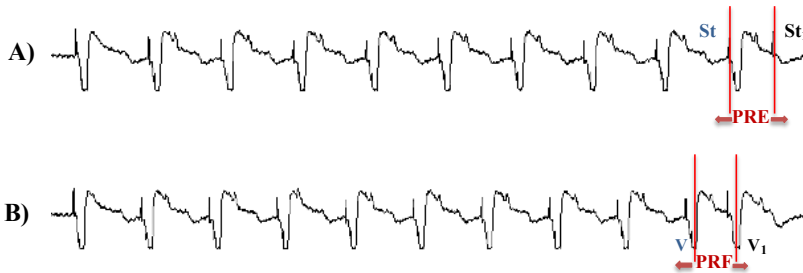


Figura 2.12: A) Medida del periodo refractario efectivo (PRE) y B) medida del refractario funcional (PRF), determinados con la aplicación del test del extraestímulo ventricular.

En el presente trabajo se realizó el TEEV con diferentes longitudes de ciclo de estimulación y se emplearon trenes de 10 estímulos que se aplicaron con una intensidad doble del umbral diastólico y con una duración del pulso rectangular de corriente de 2 ms. El TEEV se realizó primero con el ciclo de estimulación de 250 ms en cada una de las zonas de estimulación: apical izquierda, apical derecha, basal izquierda y basal derecha. Posteriormente se realizó el TEEV con el ciclo de 150 ms en estas mismas zonas de estimulación.

2.2.4.1.2. Determinación de los parámetros electrofisiológicos de refractariedad durante la fibrilación ventricular

El análisis de la FV se ha efectuado manteniendo la perfusión coronaria. Esto permite mantener un estado metabólico adecuado durante el desarrollo de la arritmia, y excluir modificaciones de las características del patrón fibrilatorio y de los efectos del fármaco en estudio causadas por la supresión del flujo coronario. En la figura 2.13 se observa el registro de FV obtenido desde la superficie epicárdica en un corazón aislado de conejo.

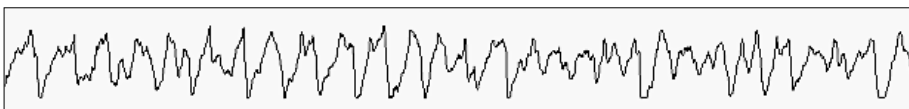


Figura 2.13: Registro electrográfico de un episodio de fibrilación ventricular en uno de los casos estudiados.

2. Material y métodos

En los registros de FV se realizó un análisis temporal mediante la medida de los intervalos entre activaciones ventriculares consecutivas y también un análisis de la fibrilación en el dominio de la frecuencia. En el caso de que no se hubiera desencadenado la arritmia durante la aplicación del test del extraestímulo, la fibrilación ventricular se indujo mediante la estimulación a frecuencias crecientes desde 4 Hz hasta su desencadenamiento. El incremento de frecuencia fue de 2 pulsos por segundo cada 3 segundos. La intensidad de estimulación fue cuatro veces superior a la del umbral diastólico. En el caso de no llegar a desencadenar la arritmia, el procedimiento se repitió las veces necesarias hasta conseguirlo.

Parámetros en el dominio del tiempo:

Para la obtención de los intervalos entre las activaciones ventriculares consecutivas (intervalos V-V), fue necesario realizar un marcado en la señal fibrilatoria con la metodología previamente descrita, que se basa en la identificación de los puntos con máxima pendiente negativa de los electrogramas. El marcado se realizó a lo largo de intervalos de 2 segundos en el minuto 5 después de iniciada la arritmia, utilizando el programa “*Marcar Z*”, detallado en el apartado 2.1.5. Las marcas fueron revisadas posteriormente usando un método semiautomático, que permitió eliminar o modificar señales incorrectas. La figura 2.14 muestra el marcado de los electrogramas.

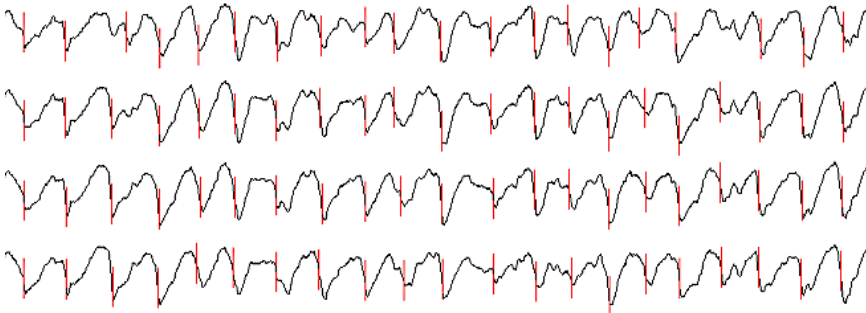


Figura 2.14: Registros obtenidos durante la fibrilación ventricular. En rojo se observan las marcas en cada instante de activación local miocárdica.

Al proceder al análisis de la arritmia en el dominio del tiempo, se utilizó el programa “*Estadísticas M*” confeccionado por nuestro grupo para la determinación de la media de los intervalos V-V. Los intervalos V-V de la FV se definen como el tiempo transcurrido entre dos activaciones locales consecutivas. Este parámetro puede denominarse también intervalo de activación ventricular o intervalo fibrilatorio (Figura 2.15).

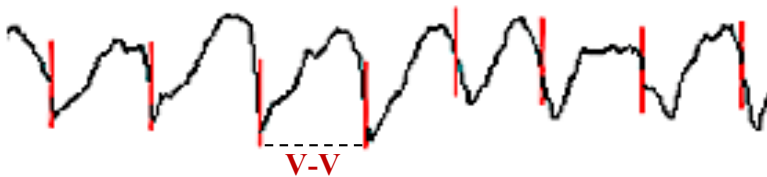


Figura 2.15: Determinación del intervalo V-V en un electrograma ventricular.

Una vez determinados los intervalos VV se construyeron los histogramas correspondientes y a partir de ellos se calculó el percentil 5. El percentil 5 de los intervalos VV durante la FV se considera una aproximación al periodo refractario funcional durante la FV (PRFFV) (Duytschaever *et al.*, 2001). Se trata de un parámetro representativo de la refractariedad del tejido miocárdico durante la arritmia. El P5 representa,

2. Material y métodos

en una distribución normal de los intervalos VV, el valor (en ms) por debajo del cual quedan englobados un 5% de intervalos VV (Figura 2.16).

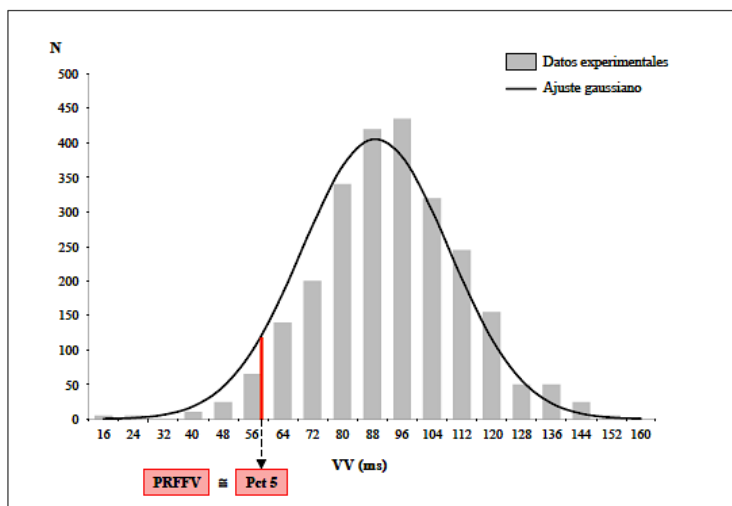


Figura 2.16: Determinación del P5 (Pct5) a partir de la distribución normal de los intervalos VV obtenidos. Figura tomada de del Canto (2014).

Parámetros en el dominio de la frecuencia:

La frecuencia dominante es la frecuencia que presenta el pico máximo en el espectro de potencia de la señal fibrilatoria. Así pues, tras la descomposición de la señal fibrilatoria ventricular mediante la transformada de Fourier en sus distintos armónicos, la frecuencia del armónico que presenta mayor amplitud es lo que se denomina frecuencia dominante. El concepto puede verse ilustrado en la figura 2.17.

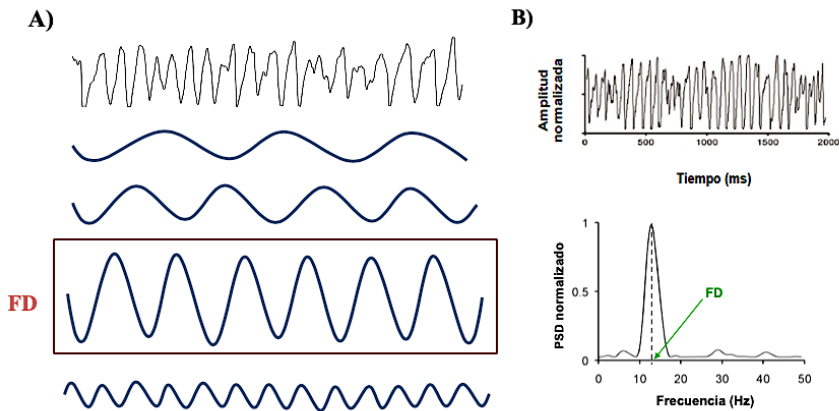


Figura 2.17: A) Ejemplo de descomposición de la señal fibrilatoria en sus distintos armónicos mediante la transformada de Fourier, correspondiendo la de mayor amplitud a la FD. B) Señal temporal de un trazado fibrilatorio con su correspondiente espectro de potencia. Abreviaturas: PSD = densidad espectral de potencia; ms = milisegundos; Hz = hercios; FD= frecuencia dominante.

Se calculó la frecuencia dominante media para cada segmento y canal. Se utilizó el periodograma modificado de Welch para obtener el espectro de potencia de las señales registradas. Dicho periodograma se calculó para los primeros 4 segundos de cada señal (4096 puntos, con una frecuencia de muestreo de 1kHz), fragmentando este intervalo en 8 segmentos con un solapamiento del 50%, aplicando la ventana de Hamming.

En los corazones portadores de infarto hubo zonas de registro electrográfico con las siguientes características: bajo voltaje, simultaneidad absoluta de los trazados e identidad morfológica. Estos registros fueron desestimados para el análisis de la señal fibrilatoria, definiendo estas áreas como zonas infartadas en las que se delimitaron las zonas limítrofes y lejanas. Ha sido en estas zonas donde se han analizado tanto los parámetros electrofisiológicos anteriormente citados para determinar la refractariedad como aquellos parámetros utilizados para determinar la heterogeneidad y

2. Material y métodos

que se detallan más adelante. La figura 2.18 muestra un esquema de las zonas de estudio: infartada, limítrofe y lejana seleccionadas en la matriz correspondiente al electrodo múltiple de registro.

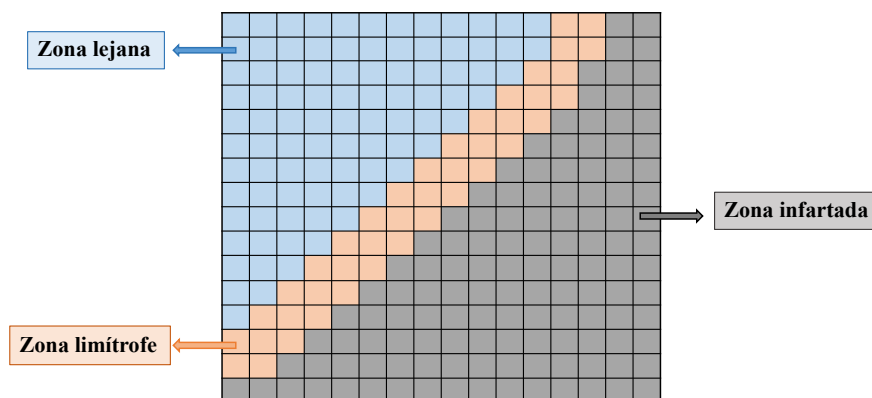


Figura 2.18: Ejemplo de las tres zonas de estudio: infartada, limítrofe y lejana, seleccionadas en la matriz del electrodo múltiple de registro, tanto en el grupo infartado como en el grupo tratado con ácido valproico.

La zona infartada corresponde a aquella en la que los electrodos registran la actividad eléctrica cuyas características, antes mencionadas, los hacen susceptibles de eliminación; la zona limítrofe es la de los electrodos que se encuentran inmediatamente adyacentes a la zona infartada, y finalmente la zona lejana corresponde a la de los registros obtenidos con el resto de los electrodos de la matriz.

En el grupo falso operado se seleccionaron dos zonas, equivalentes a la zona “limítrofe” y a la “lejana”. La figura 2.19 muestra un ejemplo de las zonas limítrofe y lejana seleccionadas en el grupo falso operado.

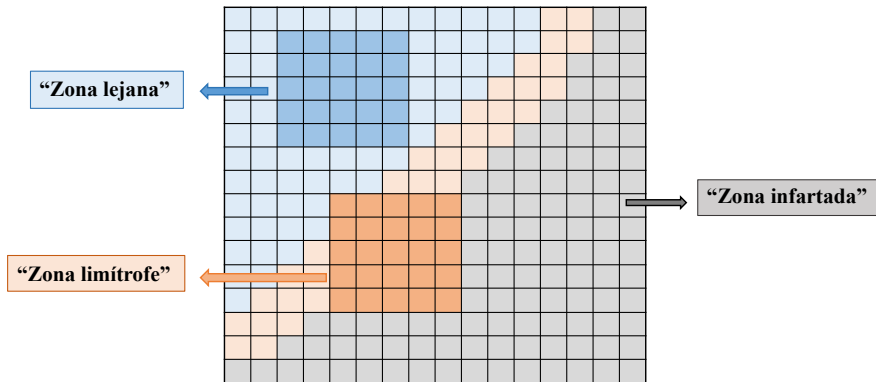


Figura 2.19: Ejemplo de la selección de las zonas límite y lejana en la matriz del multielectrodo de registro en el caso del grupo falso operado.

Los parámetros electrofisiológicos relacionados con la refractariedad y la heterogeneidad han sido analizados en el mismo número de electrodos en cada zona experimental.

2.2.4.2. Parámetros de heterogeneidad electrofisiológica

Uno de los mecanismos que facilita la inducción y la perpetuación de la fibrilación ventricular se asienta en la heterogeneidad electrofisiológica, que determina una propagación irregular de los frentes de activación y la aparición de bloqueos unidireccionales. El estudio de la heterogeneidad permite disponer de mayor conocimiento entorno a la precipitación de la arritmia en nuestro modelo experimental.

En el presente trabajo, se ha evaluado la heterogeneidad mediante el análisis del coeficiente de variación (CV) de distintos parámetros electrofisiológicos y de la concentración espectral de la fibrilación ventricular.

2. Material y métodos

Análisis del coeficiente de variación

Se ha determinado el coeficiente de variación de los intervalos V-V (CV_{VV}), del percentil 5 (CV_{P5}) y de la frecuencia dominante (CV_{FD}) obtenidos en los registros de la FV correspondientes a los distintos electrodos de la placa multielectrodo. La fórmula aplicada ha sido:

$$CV = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio}} \times 100$$

Análisis de la concentración espectral

El análisis del espectro de frecuencias aporta información acerca de la organización o regularidad de la activación miocárdica durante la arritmia. Como se ha visto en el apartado de la frecuencia dominante, una señal perfectamente periódica se descompone en una señal sinusoidal cuya frecuencia es igual a la FD y en sinusoides adicionales cuyas frecuencias son múltiplos (armónicos) de la FD. Sin embargo, una señal irregular y desorganizada posee otros componentes cuyas frecuencias no son armónicos de la FD. Así, una señal perfectamente periódica tiene todo su espectro de potencia concentrado en la frecuencia dominante y en sus armónicos, por el contrario, una señal irregular no periódica tiene un menor porcentaje del área del espectro bajo la frecuencia dominante. El cálculo de este porcentaje (concentración espectral) aporta información sobre la organización y la regularidad de las señales de FV.

En la figura 2.20 se observa un ejemplo de los dos tipos de señales y sus correspondientes espectros de potencia. La concentración espectral es el cociente entre el área del espectro contenida en el intervalo $FD \pm 0,5$ Hz, dividido por el área total del espectro de potencia de la señal.

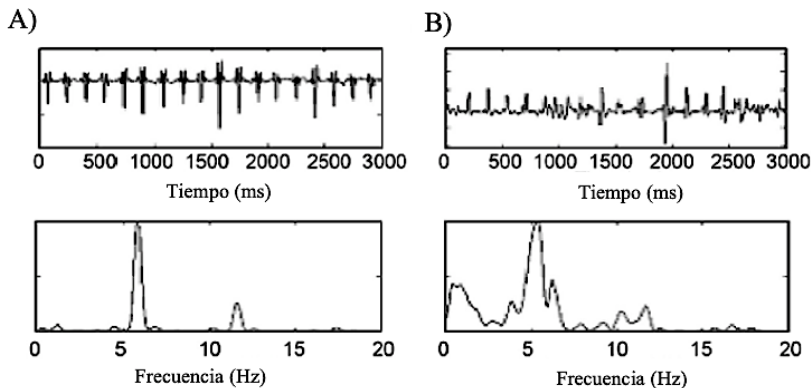


Figura 2.20: En la parte superior se muestran dos ejemplos de electrogramas y en la inferior sus correspondientes espectros de potencia. **A)** Electrogramas con intervalos más regulares y **B)** Electrogramas con intervalos más irregulares. La señal (A) posee un mayor porcentaje del área del espectro de potencia alrededor de la frecuencia dominante y sus armónicos, mientras que la (B) presenta un porcentaje menor. Figura tomada de Ng y Goldberger (2007).

2.2.4.3. Validación de los registros de fibrilación ventricular obtenidos con los diferentes electrodos

El análisis de los procesos de activación durante la FV se ha efectuado a partir de los registros epicárdicos obtenidos con el electrodo múltiple situado sobre la pared anterolateral del ventrículo izquierdo. Los registros son unipolares y los tiempos de activación local que permiten construir los mapas de activación se han determinado, tal y como se ha descrito anteriormente, identificando los puntos con máxima pendiente negativa de los electrogramas (Durrer y Van Der Tweel, 1954; Spach y Kootsey, 1985; Cardinal *et al.*, 1988; Stevenson y Soejima, 2005; De Bakker y Van Rijen, 2007). La utilización de registros unipolares permite identificar con precisión las activaciones locales, aunque las señales registradas pueden verse alteradas por potenciales generados durante la activación de zonas remotas, así como por interacciones electrotónicas entre la zona explorada y las vecinas (Thomas *et al.*, 2005).

2. Material y métodos

Por otra parte, la sustitución de tejido miocárdico por tejido fibroso en los grupos con infarto determina que existan zonas de tejido no excitable. Los registros obtenidos en las zonas de cicatriz compacta, en las que no existe activación local ni transmisión de frentes de activación, corresponden a activaciones remotas (Cardinal *et al.*, 1988; De Bakker y van Rijen, 2007). Estas señales son de inscripción más lenta, no muestran patrones de progresión de la activación (son simultáneas) y su morfología es muy similar en los registros de las zonas adyacentes (figura 2.21).

Los criterios utilizados para excluir registros (electrodos) del análisis de los procesos de activación han sido los siguientes: a) ausencia de cambios en la morfología de los electrogramas con respecto a los electrodos adyacentes; b) ausencia de evidencia de propagación de la activación, determinada con las señales registradas (simultaneidad de las señales); c) ausencia de deflexiones negativas rápidas. Estos criterios han sido aplicados en los tres grupos experimentales. En el grupo de falsos operados las dificultades para identificar los procesos de activación han correspondido a la presencia de zonas de fibrosis pericárdica que determinaban un mal contacto de los electrodos.

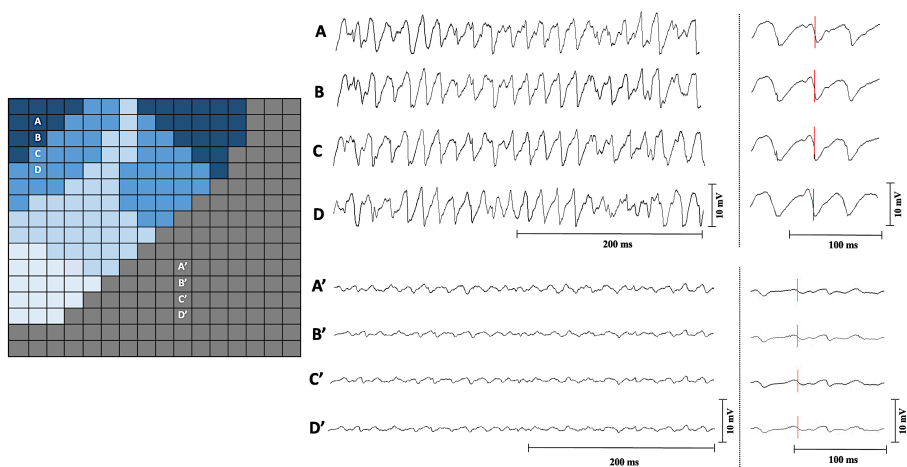


Figura 2.21: Ejemplo de registros electrocardiográficos en fibrilación ventricular en un caso del grupo control.

2.2.4.4. Inducibilidad de arritmias

Para el estudio de la inducibilidad de fibrilación ventricular se ha aplicado el test del extraestímulo ventricular con ciclos básicos (250 y 150 ms) y emitiendo uno, dos, o tres extraestímulos en las diferentes zonas situadas alrededor de la zona infartada y anteriormente descritas: apical izquierda, apical derecha, basal izquierda y derecha (figuras 2.22 y 2.23).

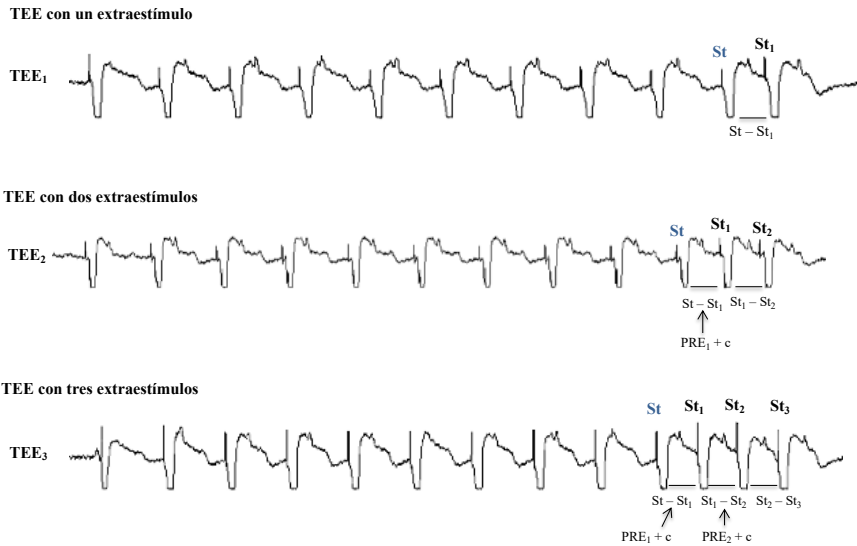


Figura 2.22: Test del extraestímulo ventricular (TEE) realizado con uno (St_1), dos (St_2) y tres (St_3) extraestímulos.

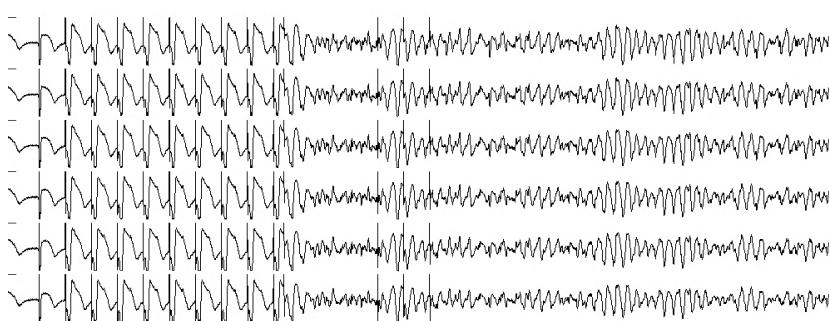


Figura 2.23: Ejemplo de un caso experimental en el que se desencadena una fibrilación ventricular durante la aplicación del test del extraestímulo ventricular. La figura ha sido extraída del software empleado para el análisis de la señal *Pacemap*.

2. Material y métodos

2.2.5. Determinación del tamaño del infarto

Tras completar el estudio electrofisiológico se procedió a la cuantificación del tamaño del infarto respecto al ventrículo izquierdo y al área de riesgo (la cuantificación se ha realizado en las secciones del ventrículo izquierdo obtenidas a partir de la zona de oclusión de la arteria coronaria y por tanto no se refieren a la totalidad del ventrículo). Con este objetivo se ocluyó la arteria coronaria circunfleja en el lugar donde se había efectuado la ligadura transitoria al inducir el infarto (en el primer tercio de su recorrido) y el corazón se perfundió retrógradamente a través de la aorta con una solución de tioflavina-S (8 mg/ml). Una vez perfundida la tioflavina-S, se procedió a seccionar el corazón con un dispositivo diseñado expreso para este proyecto (figura 2.24.A y B).

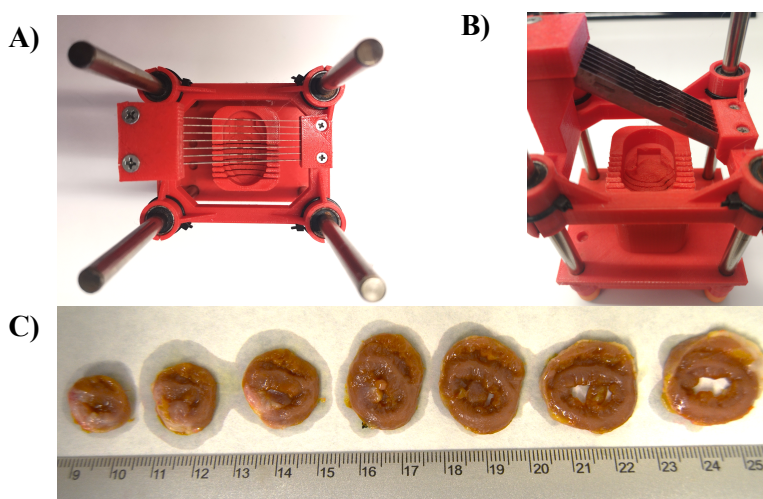


Figura 2.25: A y B) Dispositivo diseñado para realizar las secciones del corazón necesarias para determinar el área de riesgo y el tamaño del infarto. Se muestran las cuchillas y el depósito para el corazón que forman parte del dispositivo. C) Muestra de las secciones transversales de 3 mm de grosor de un corazón realizadas con el dispositivo.

Una vez obtenidas las secciones del corazón, se obtuvieron una serie de fotografías con luz ambiental y con luz ultravioleta a dos longitudes de onda (254 y 365 nm). Tras esto, se procedió a la tinción de cada una de las secciones sumergiendo a las mismas en una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (10 g/L). Una vez incubadas y teñidas las secciones se procedió a fotografiarlas con luz ambiente para la posterior cuantificación del tamaño del infarto.

El área de riesgo se identificó como el área de tejido que no emitió fluorescencia bajo la luz ultravioleta. Se realizó el mismo protocolo experimental en el grupo falso operado. La figura 2.25 muestra un ejemplo de las distintas tinciones empleadas para el análisis del área de riesgo y de la zona infartada en los distintos grupos experimentales.

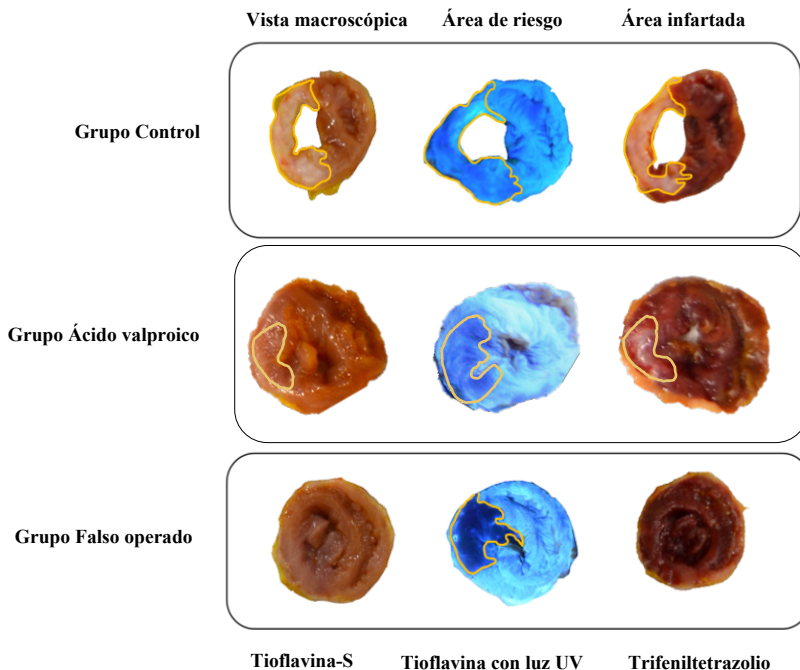


Figura 2.25: Muestra de una rodaja de corazón seccionado con las distintas tinciones empleadas en el grupo falso operado, control y tratado.

2. Material y métodos

Una vez obtenidas las imágenes se digitalizaron y se cuantificaron manualmente las zonas de interés empleando el paquete de software MATLAB 8.4. Todas las imágenes fueron fotografiadas con una regla colocada junto a las secciones del miocardio como referencia para las mediciones. Estas determinaciones junto con el grosor de corte predefinido (3 mm), permitió calcular el porcentaje de tejido ventricular izquierdo infartado, así como el porcentaje con respecto al área de riesgo. La cuantificación se realizó en tres secciones (corte 1, 2 y 3), ubicadas debajo de la ligadura de la oclusión coronaria. Un ejemplo de la ubicación de las secciones se muestra en la figura 2.26.

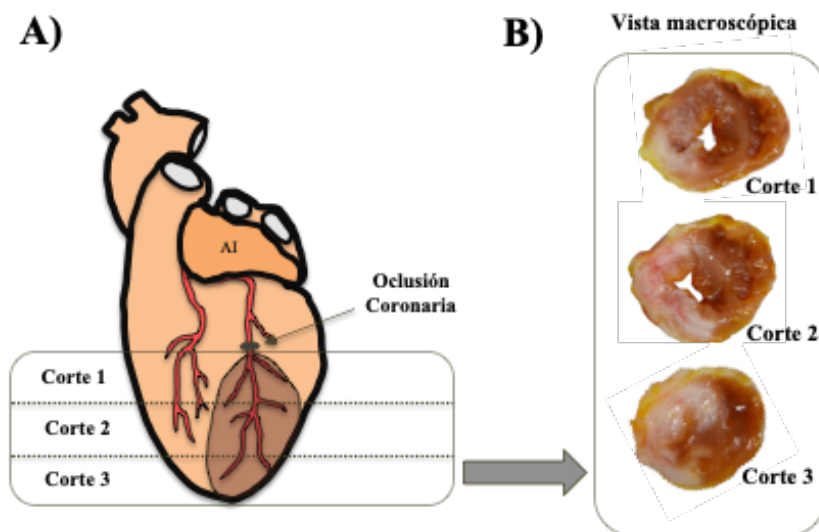


Figura 2.26: **A)** Representación esquemática de las secciones del corazón (corte 1, 2 y 3) ubicadas debajo de la ligadura coronaria. La zona oscura corresponde al área infartada. **B)** Ejemplo de las tres secciones con tinción de tioflavina-S sin luz ultravioleta para su observación macroscópica. El tejido necrótico se representa en cada sección. Abreviaturas: AI: aurícula izquierda.

2.2.6. Resumen del protocolo experimental

Producción de infarto agudo de miocardio y controles posteriores.

1. Administración de premedicación analgésica, antibiótica, antiinflamatoria y de agentes anestésicos y sedantes. Habilitación de vías intravenosas.
2. Inducción anestésica, intubación endotraqueal, monitorización de parámetros clínicos y preparación del campo quirúrgico.
3. Esternotomía media, pericardiotomía y exposición del corazón para la localización de la arteria coronaria circunfleja izquierda.
4. Oclusión coronaria mediante ligadura de la arteria durante una hora. Reperusión mediante retirada de la ligadura.
5. Cierre de la esternotomía por planos mediante procedimientos de sutura estándar.
6. Aplicación del protocolo de cuidados postoperatorios específicos durante la primera semana tras la cirugía.
7. Supervisión y mantenimiento de los animales durante las 5 semanas de estabulación a partir del día de la cirugía.
8. Realización de ecocardiografías en la segunda y quinta semana.
9. Administración diaria del ácido valproico por vía subcutánea en el grupo tratado.

Estudio electrofisiológico en el corazón aislado.

El protocolo fue el mismo para los tres grupos experimentales: falso operado, control y tratado con ácido valproico. Una vez extraído el corazón y colocado en el sistema de perfusión, se inició el periodo de estabilización durante el que se procedió a la ubicación de los electrodos de estimulación

2. Material y métodos

y de registro. Durante este periodo de estabilización se realizaron determinaciones del flujo coronario cada 5 minutos durante 20 minutos. A continuación, el protocolo incluyó (figura 2.27):

1. Registro electrográfico basal para la determinación de la longitud de ciclo sinusal (LCS).
2. Determinación del umbral de estimulación ventricular.
3. Estimulación ventricular en la zona basal derecha (BD) a frecuencias crecientes.
4. Determinación del flujo coronario.
5. Aplicación del test del extraestímulo ventricular (TEEV) en las zonas BI, BD, AI y AD con diferentes ciclos de estimulación para la determinación del periodo refractario y estudio de la inducibilidad de arritmias.
6. Inducción de fibrilación ventricular a frecuencias crecientes si el ventrículo no fibrilaba con la aplicación del test del extraestímulo.
7. Registros electrocardiográficos de la fibrilación durante cinco minutos para el posterior análisis de la arritmia.
8. Desfibrilación mediante la utilización de un desfibrilador manual aplicando choques de ondas bifásicas e iniciando la energía a aplicar en 0,1 julios e incrementándola sucesivamente hasta conseguir la reversión de la arritmia.
9. Registro electrográfico (10'') en ritmo sinusal inmediatamente después de la desfibrilación y una vez transcurridos cinco minutos.
10. Determinación del flujo coronario.

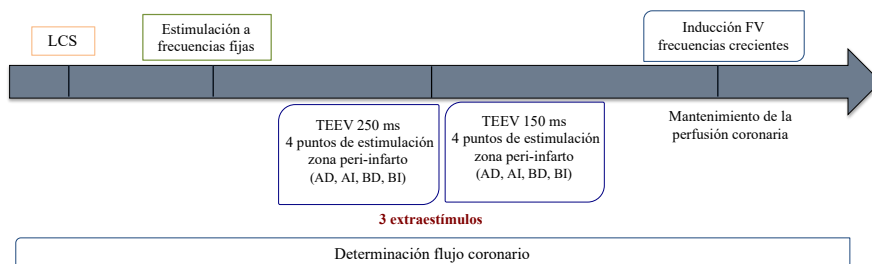


Figura 2.27: Esquema detallado del protocolo electrofisiológico aplicado. Los 4 puntos de estimulación hacen referencia a las zonas de estimulación próximas a la zona infartada: basal derecha (BD), basal izquierda (BI), apical derecha (AD) y apical izquierda (AI); LCS: longitud del ciclo sinusal; FV: fibrilación ventricular.

2.2.7. Análisis estadístico

Los datos se han presentado como media \pm desviación estándar. La normalidad de las distribuciones de los datos se verificó mediante el test de Kolmogrov-Smirnov, y la homogeneidad de varianzas se contrastó mediante la prueba de Levene.

Para investigar si existen diferencias en los parámetros electrofisiológicos determinados durante la FV, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) factorial con un factor inter-sujeto (grupo: FO, C, AV) y un factor intra-sujeto (zona: límite y lejano). Para analizar si existen diferencias en el tamaño del infarto, el área de riesgo, la refractariedad y heterogeneidad determinadas durante el TEEV, se utilizó un ANOVA de un factor entre sujetos (grupo: FO, C, AV). Finalmente, para estudiar las diferencias en los marcadores bioquímicos y los parámetros ecocardiográficos, se empleó un ANOVA factorial con un factor inter-sujeto (grupo) y un factor intra-sujeto (tiempo). Se aplicó la corrección de Bonferroni (análisis post-hoc) para las comparaciones por pares.

2. Material y métodos

El análisis de las diferencias entre variables cualitativas (inducibilidad de la FV) se realizó mediante el test chi-cuadrado para tablas de contingencia.

El análisis de la relación entre pares de variables se efectuó mediante la determinación de los coeficientes de correlación correspondientes (regresión lineal, R de Pearson). El análisis multivariado se efectuó aplicando el método de regresión múltiple escalonado considerando aquellas variables independientes con coeficientes de correlación cuya significación fuera menor de 0,1.

2.2.8. Legislación

Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales llevados a cabo en el presente trabajo fueron realizados de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Dicho decreto se articuló siguiendo las directrices de la Directiva 2010/63/UE. Además, el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universitat de València aprobó los procedimientos experimentales empleados en el presente estudio (2015/VSC/PEA/00233).

Capítulo 3

RESULTADOS

3.1. Marcadores bioquímicos de necrosis, en suero

En la figura 3.1 se muestran los resultados correspondientes a los valores de troponina T. En el grupo control se observa un incremento estadísticamente significativo del valor de la TnT a los 5 minutos ($149,41 \pm 106,52$ pg/ml) y a la hora del inicio de la reperfusión ($2390,96 \pm 1435,19$ pg/ml) respecto al valor obtenido en el momento de la pre-oclusión coronaria ($16,46 \pm 10,85$ pg/ml). En cuanto al grupo tratado, el valor de la troponina T también fue significativamente mayor a los cinco minutos ($175,94 \pm 87,87$ pg/ml) y a la hora del inicio de la reperfusión ($1333,16 \pm 1285,73$ pg/ml) con respecto al momento de pre-oclusión coronaria ($12,89 \pm 5,32$ pg/ml). En el caso del grupo falso operado, se observa que el valor de este parámetro a los cinco minutos ($139,52 \pm 90,12$ pg/ml) y a la hora del inicio de la reperfusión ($363 \pm 218,51$ pg/ml) también aumenta significativamente respecto al momento pre-oclusión ($14,67 \pm 7,71$ pg/ml).

Al comparar entre sí los distintos grupos experimentales se observa que, a la hora del inicio de la reperfusión, el incremento en los valores de la troponina T del grupo control ($2390,96 \pm 1435,19$ pg/ml) es significativamente mayor que el del grupo falso operado ($363,88 \pm 218,51$ pg/ml $p < 0,05$) y que el del grupo tratado con ácido valproico ($1333,26 \pm 1285,73$ pg/ml $p < 0,05$).

3. Resultados

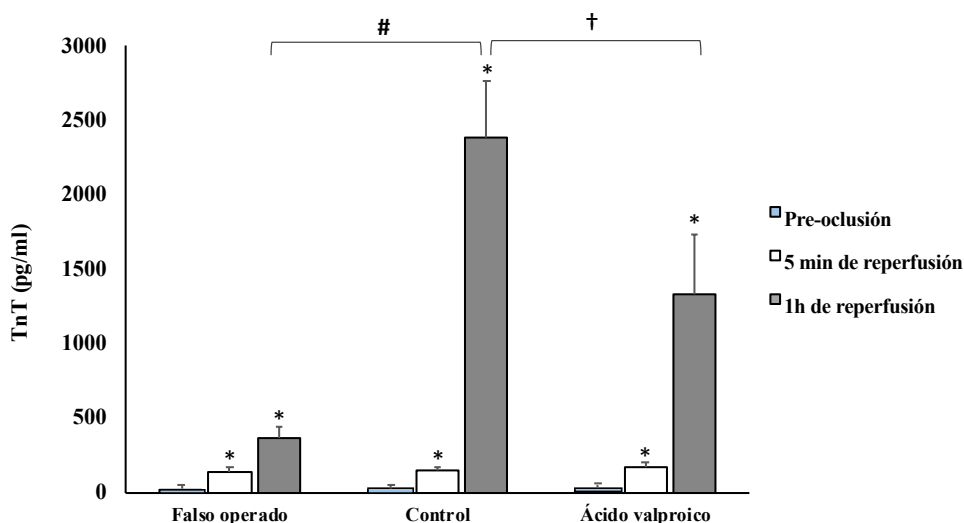


Figura 3.1: Representación de los valores de troponina T (TnT) analizados en los grupos experimentales falso operado, control y tratado con ácido valproico en los 3 instantes temporales: pre-oclusión, a los 5 minutos del inicio de la reperusión y a la hora del inicio de la reperusión. Se representan los valores medios \pm Error Estándar. * $p < 0,05$ respecto a pre-oclusión. # $p < 0,05$ respecto a 1h de reperusión del grupo falso operado. † $p < 0,05$ respecto a 1h de reperusión del grupo control.

3.2. Estudio ecocardiográfico

La figura 3.2 muestra los parámetros ecocardiográficos relacionados con el tamaño ventricular obtenidos en los tres grupos experimentales en la semana 2 y 5 tras la inducción del infarto de miocardio. El diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo (DdVI) en la semana 2 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. En la semana 5 el DVI_d del grupo control fue significativamente mayor que el del grupo falso operado ($16,2 \pm 2,2$ vs. $12,73 \pm 5,3$ mm, $p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas semanas (figura 3.2.A).

El diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo (DsVI) no mostró diferencias estadísticamente significativas en la semana 2. En la semana

5 el DsVI del grupo control fue significativamente mayor que el del grupo falso operado ($10 \pm 1,6$ vs. $7,4 \pm 1$ mm, $p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas semanas (figura 3.2.B).

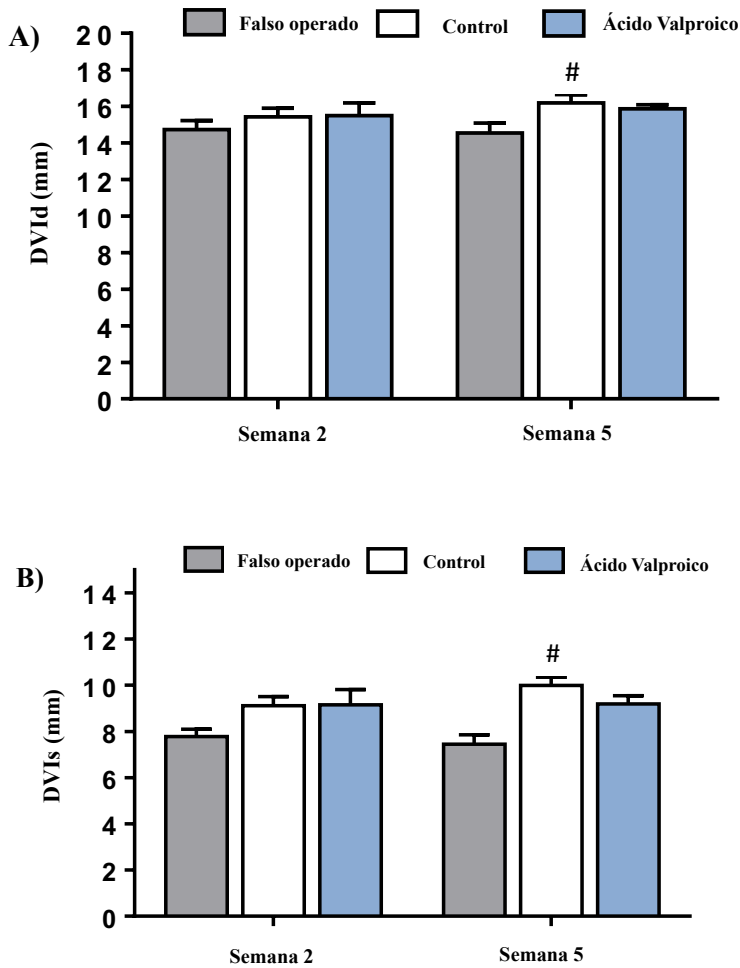


Figura 3.2: A) Representación de los valores del diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo (DVID) y B) Representación de los valores del diámetro teletólico del ventrículo izquierdo (DVI). En A y B se representan los valores medios \pm DE obtenidos en la semana 2 y 5 en los grupos experimentales: falso operado, control y tratado con ácido valproico y # $p < 0,05$ respecto al grupo falso operado semana 5.

3. Resultados

La figura 3.3 muestra la fracción de eyección obtenida en los tres grupos experimentales en la semana 2 y 5. En la semana 2 la fracción de eyección del grupo control fue significativamente menor que la del grupo falso operado ($63,8 \pm 5,8$ vs. $70,3 \pm 3,2$ %, $p < 0,05$). También en la semana 5 la fracción de eyección del grupo control fue significativamente menor que la del grupo falso operado ($60,4 \pm 5,2$ vs. $72 \pm 3,1$ %, $p < 0,05$). Asimismo, en la semana 5 la fracción de eyección del grupo tratado fue significativamente menor que la del grupo falso operado ($64,6 \pm 5,8$ vs. $72 \pm 3,1$ %, $p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas semanas.

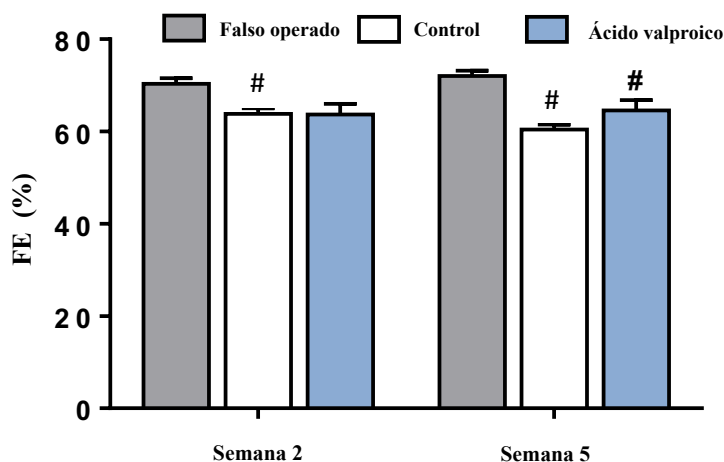


Figura 3.3: Representación de los valores de la fracción de eyección (FE). Se representan los valores medios \pm DE obtenidos en la semana 2 y 5 en los grupos experimentales: falso operado, control y tratado con ácido valproico. # $p < 0,05$ respecto al grupo falso operado.

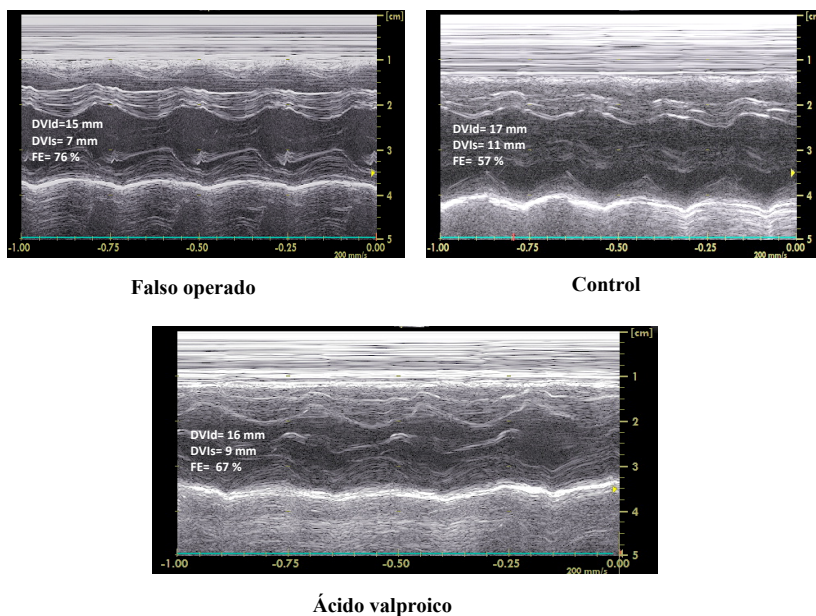


Figura 3.4: Imágenes en modo M del ventrículo izquierdo obtenidas en un experimento del grupo falso operado, control y ácido valproico. Se muestran los parámetros ecocardiográficos: diámetro telediastólico (DVID) y telesistólico (DVIs) del ventrículo izquierdo y la fracción de eyección (FE).

En cuanto al diámetro de la raíz aórtica y el diámetro auricular izquierdo, no se alcanzó la significancia estadística al comparar entre los distintos grupos experimentales, ni entre ambas semanas (tabla 3.1).

Parámetros	Falso operado		Control		Ácido valproico	
	Semana 2	Semana 5	Semana 2	Semana 5	Semana 2	Semana 5
Diam. Ao (mm)	9,15 ± 0,43	9,5 ± 0,84	9,11 ± 0,56	9,27 ± 0,62	9,19 ± 0,26	9,57 ± 0,46
Diam. AI (mm)	8,9 ± 0,71	9,93 ± 1,55	9,13 ± 1,6	9,21 ± 1,52	8,52 ± 0,72	8,86 ± 1,78

Tabla 3.1: Valores de los parámetros ecocardiográficos: diámetro de la raíz aórtica (Diam. Ao) y diámetro auricular izquierdo (Diam. AI). Se representan los valores medios ± DE obtenidos en la semana 2 y 5 en los grupos experimentales: falso operado, control y tratado con ácido valproico. Valores en milímetros.

3. Resultados

3.3. Tamaño del infarto y área de riesgo

El tamaño del infarto se cuantificó mediante la media aritmética de las secciones del ventrículo izquierdo que se ubicaron por debajo de la ligadura coronaria. Las secciones se dividieron en tres rodajas de igual espesor. En relación con estas secciones el tamaño del infarto en el grupo control fue significativamente mayor que el del grupo tratado con ácido valproico ($38,6 \pm 16,4$ vs. $19,3 \pm 7,8$ % $p < 0,05$). En el grupo control el tamaño del infarto fue de un $69,8 \pm 20,4$ % y en el grupo tratado de un $40,3 \pm 5,3$ % ($p < 0,05$) respecto al área de riesgo (figura 3.5).

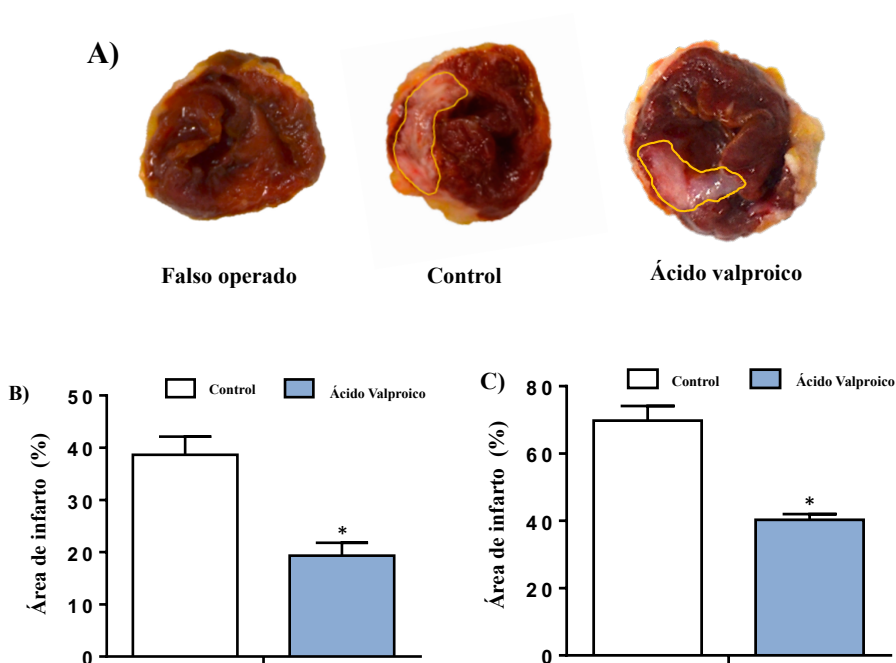


Figura 3.5: A) Un caso del grupo falso operado donde no se observa área infartada, y un caso del grupo control y del grupo tratado con ácido valproico donde se observa área infartada. B) Representación de los valores medios \pm DE del tamaño del infarto con respecto al ventrículo izquierdo en los grupos control y tratado con ácido valproico. C) Representación de los valores medios \pm DE del tamaño del infarto con respecto al área de riesgo en los grupos control y tratado con ácido valproico. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

Se analizó el tamaño del área de riesgo de los tres grupos experimentales para corroborar la reproducibilidad de la ubicación de la ligadura coronaria. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p= 0,226$). El porcentaje del área de riesgo fue en el grupo falso operado de un $48,4 \pm 9,4 \%$, en el grupo control de un $54,8 \pm 14,7 \%$ y en el grupo tratado de un $47 \pm 16,5 \%$ (figura 3.6).

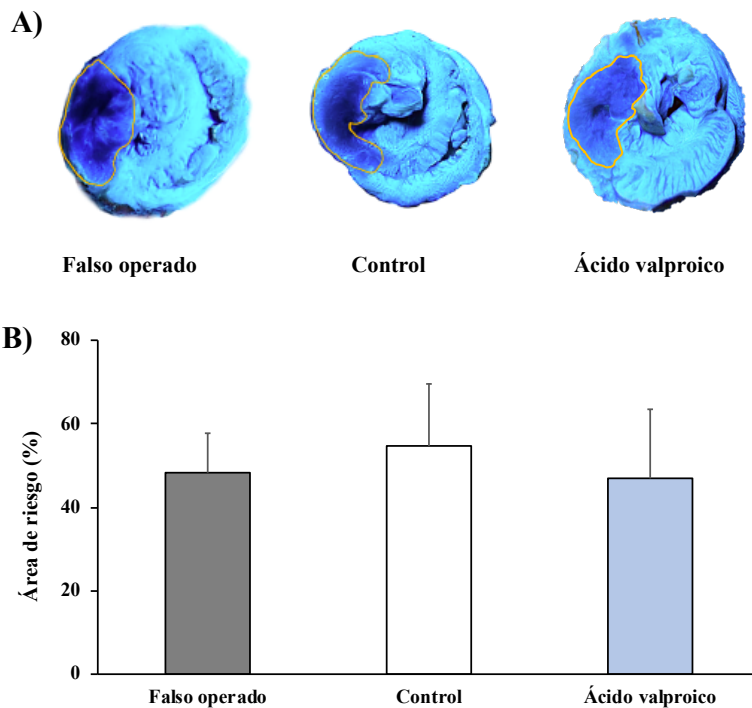


Figura 3.6: **A)** Área de riesgo, muestra imágenes representativas del tejido teñido en los grupos falso operado, control y tratado con ácido valproico. **B)** Representación de los valores medios \pm DE del área de riesgo en los grupos falso operado, control y tratado con ácido valproico.

3. Resultados

3.4. Estudio electrofisiológico

3.4.1. Análisis de la refractariedad miocárdica

3.4.1.1. Periodos refractario efectivo y funcional determinados con el TEEV

En la tabla 3.2 se muestran los valores correspondientes al periodo refractario efectivo determinado con el test del extraestímulo ventricular siendo las longitudes del ciclo de estimulación 250 ms y 150 ms. Se muestra el valor promedio del PRE de las cuatro zonas de estimulación obtenido con un extraestímulo. En cuanto a los resultados, tanto en el grupo falso operado como en el control el valor del PRE con la longitud del ciclo de estimulación de 150 ms fue menor que el PRE obtenido con 250 ms. En el grupo tratado no se alcanzó la significancia estadística al comparar ambos ciclos entre sí. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el PRE promedio obtenido en los distintos grupos experimentales tanto con el ciclo de estimulación de 250 ms como con el de 150 ms.

PRE (ms)	250 ms	150 ms
Falso operado	128 ± 15	112 ± 12 *
Control	133 ± 18	117 ± 20 *
Ácido valproico	134 ± 15	125 ± 13

Tabla 3.2: Valores del periodo refractario efectivo (PRE) determinados con los ciclos de estimulación 250 ms y 150 ms. Se representan los valores medios ± DE en los grupos experimentales falso operado (n= 15), control (n=22) y tratado con ácido valproico (n=10). Valores en milisegundos. * p<0,05 respecto al PRE con el ciclo de estimulación de 250 ms.

En la tabla 3.3 se muestran los valores correspondientes al periodo refractario funcional determinado con el test del extraestímulo ventricular siendo las longitudes del ciclo de estimulación 250 ms y 150 ms. Se muestra el valor promedio del PRF de las cuatro zonas de estimulación obtenido con un extraestímulo. En cuanto a los resultados, tanto en el grupo falso operado como en el control el valor del PRF con la longitud del ciclo de estimulación de 150 ms fue menor que el PRF obtenido con 250 ms. En el grupo tratado no se alcanzó la significancia estadística al comparar ambos ciclos entre sí. Tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el PRF promedio en los tres grupos experimentales tanto con el ciclo de estimulación de 250 ms como con el de 150 ms.

PRF (ms)	250 ms	150 ms
Falso operado	140 ± 15	124 ± 12 *
Control	146 ± 16	129 ± 20 *
Ácido valproico	145 ± 16	136 ± 13

Tabla 3.3: Valores del periodo refractario funcional (PRF) determinados con los ciclos de estimulación 250 ms y 150 ms. Se representan los valores medios ± DE en los grupos experimentales falso operado (n= 15), control (n=22) y tratado con ácido valproico (n=10). Valores en milisegundos. $p < 0,05$ respecto al PRF con el ciclo de estimulación de 250 ms.

3.4.1.2. Intervalos VV durante la FV

En la figura 3.7 se muestran los resultados correspondientes a la longitud del ciclo fibrilatorio (intervalos VV) analizado en la zona limítrofe y en la zona lejana en cada uno de los grupos experimentales. Los intervalos VV pertenecientes al grupo control mostraron valores significativamente mayores en la zona limítrofe con respecto a la zona lejana (84 ± 14 vs. 80 ± 13 ms, $p < 0,05$), mientras que, tanto en el grupo tratado como en el grupo falso operado no se observaron diferencias estadísticamente significativas

3. Resultados

entre ambas zonas de estudio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales al comparar tanto el valor de los intervalos VV obtenido en la zona limítrofe como en la zona lejana.

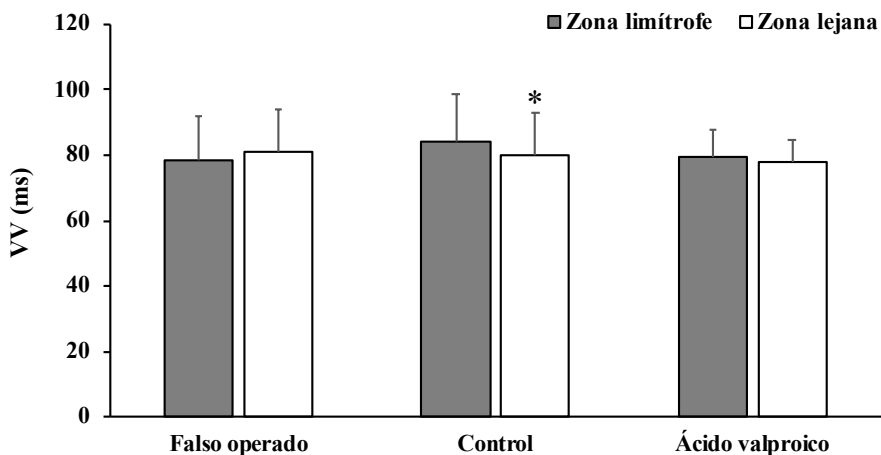


Figura 3.7: Intervalos VV durante la FV determinados en la zona limítrofe y lejana. Se representan los valores medios \pm DE en los grupos experimentales falso operado (n=15), control (n=22) y tratado con ácido valproico (n=10). * $p < 0,05$ respecto a zona limítrofe del grupo control.

3.4.1.3. Percentil 5

La figura 3.8 muestra los resultados correspondientes al percentil 5 de los intervalos VV durante la FV, analizados en la zona limítrofe y en la zona lejana. Como se ha comentado previamente, este parámetro se estima como el periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.

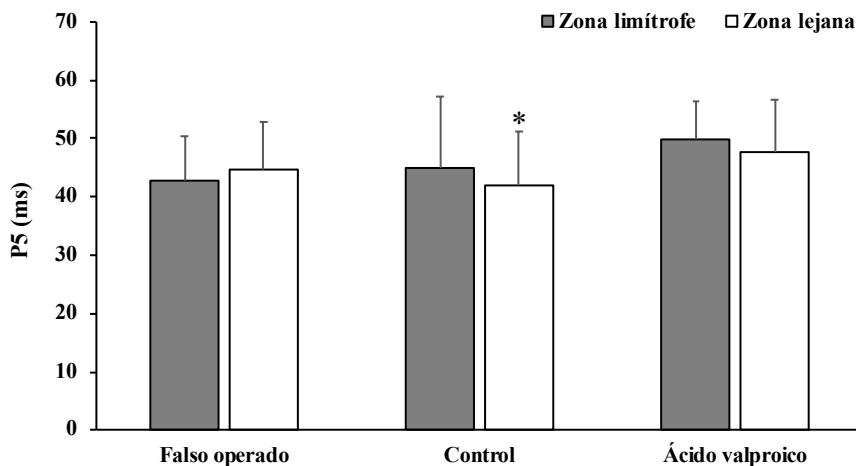


Figura 3.8: Percentil 5 (P5) de los intervalos VV durante la fibrilación ventricular, analizado en la zona limítrofe y en la zona lejana. Se representan los valores medios \pm DE en los grupos experimentales falso operado (n= 15), control (n=22) y tratado con ácido valproico (n=10). * p<0,05 respecto a zona limítrofe del grupo control.

El valor del P5 en el grupo control también fue significativamente mayor en la zona limítrofe con respecto a la zona lejana (45 ± 10 vs. 42 ± 9 ms, $p < 0,05$). En cuanto a los grupos tratado y falso operado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas zonas. Asimismo, los valores del percentil 5 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales al comparar tanto la zona limítrofe como la zona lejana.

3.4.1.4. Frecuencia dominante

En la figura 3.9 se muestra los valores medios de la frecuencia dominante determinados tanto en la zona limítrofe como en la zona lejana durante la FV, en cada uno de los grupos experimentales.

3. Resultados

En el grupo falso operado el valor de la frecuencia dominante de la zona “límitrofe” fue significativamente mayor que el valor obtenido en la zona lejana ($14,1 \pm 3,1$ vs. $12,9 \pm 3,2$ Hz, $p < 0,05$). En los grupos control y tratado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la zona límitrofe y la zona lejana. Asimismo, los valores de este parámetro no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales al comparar tanto la zona límitrofe como la zona lejana.

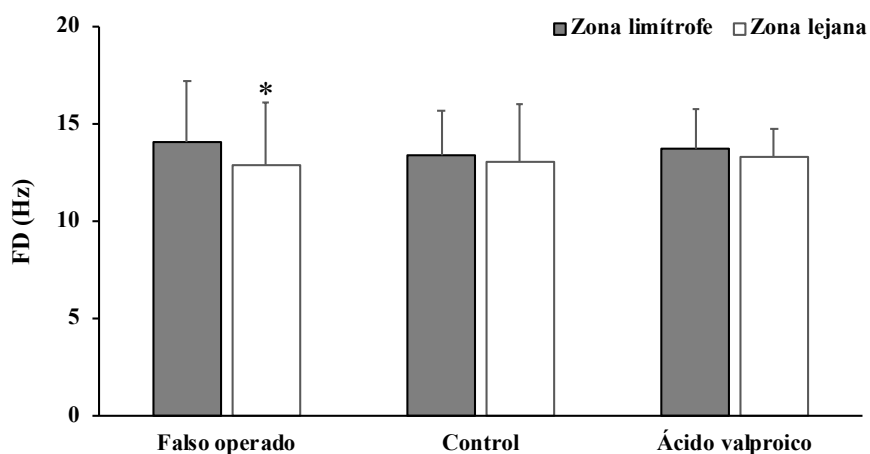


Figura 3.9: Frecuencia dominante (FD) durante la fibrilación ventricular, analizada en la zona límitrofe y en la zona lejana. Se representan los valores medios \pm DE en los grupos experimentales falso operado ($n= 15$), control ($n=22$) y tratado con ácido valproico ($n=10$). * $p < 0,05$ respecto a zona límitrofe del grupo falso operado.

3.4.2. Análisis de la heterogeneidad miocárdica

3.4.2.1. Coeficiente de variación de los periodos refractarios efectivo y funcional

A partir de la determinación de los periodos refractarios efectivo y funcional en las 4 zonas estipuladas en cada experimento, es decir (apical derecha e izquierda y basal derecha e izquierda), se han determinado los coeficientes de variación de dichos periodos refractarios en cada uno de los casos. Para la obtención del periodo refractario en cada región, se ha empleado el promedio de los valores resultantes de la aplicación del TEEV con ambos ciclos de estimulación y con 1, 2 y 3 extraestímulos. La tabla 3.4 muestra los valores del CV_{PRE} y del CV_{PRF} obtenidos en cada una de las series experimentales. En el grupo tratado con ácido valproico el CV_{PRE} fue menor que el del grupo control ($6,9 \pm 3,7$ vs. $11,3 \pm 5,4$ %, $p < 0,05$). También el CV_{PRF} en el grupo tratado fue menor que el del grupo control ($4,8 \pm 2$ vs. $8,7 \pm 4,4$ %, $p < 0,05$) y que el del grupo falso operado ($4,8 \pm 2$ vs. $7,6 \pm 3,9$ %, $p < 0,05$).

	CV_{PRE}	CV_{PRF}
Falso operado	$10,1 \pm 15$	$7,6 \pm 3,9$
Control	$11,3 \pm 5,5$	$8,7 \pm 4,4$
Ácido valproico	$6,9 \pm 3,7$ ◆	$4,8 \pm 2,1$ #◆

Tabla 3.4: Coeficiente de variación del periodo refractario efectivo (CV_{PRE}) y del periodo refractario funcional (CV_{PRF}). Se representan los valores medios \pm DE en los grupos experimentales falso operado (n= 15), control (n=22) y tratado con ácido valproico (n=10). Valores en milisegundos. # $p < 0,05$ respecto al grupo falso operado. ◆ $p < 0,05$ respecto al grupo control.

3. Resultados

3.4.2.2. Coeficiente de variación de los intervalos VV

A partir de los intervalos VV obtenidos durante la fibrilación ventricular, y sus correspondientes medias y desviaciones estándar, calculamos el coeficiente de variación de los VV (CV_{VV}), como medida de heterogeneidad electrofisiológica miocárdica (figura 3.10). En el grupo control el valor del CV_{VV} fue significativamente mayor en la zona límite con respecto a la zona lejana ($12,1 \pm 5,1$ vs. $9,2 \pm 2,9$ %, $p < 0,05$). En los grupos tratado y falso operado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor del CV_{VV} de la zona límite y el valor obtenido en la zona lejana.

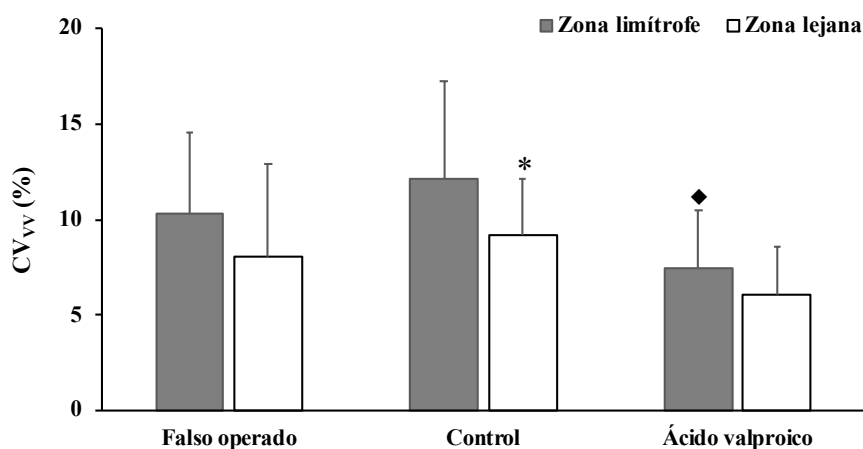


Figura 3.10: Coeficiente de variación de los intervalos VV (CV_{VV}) en la zona límite y en la zona lejana en los distintos grupos experimentales, falso operado ($n=15$), control ($n=22$) y tratado con ácido valproico ($n=10$). Se representan los valores medios \pm DE. * $p < 0,05$ respecto a zona límite del grupo control. ◆ $p < 0,05$ respecto al grupo control.

Al comparar el valor del CV_{VV} de la zona límite entre los distintos grupos experimentales, se observó que fue significativamente menor en el grupo tratado respecto al grupo control ($7,4 \pm 3$ vs. $12,1 \pm 5,1$ %, $p < 0,05$). El valor del CV_{VV} correspondiente a la zona lejana no alcanzó la significancia estadística al comparar entre los grupos experimentales.

3.4.2.3. Coeficiente de variación del P5

La figura 3.11 muestra los resultados correspondientes a los valores del coeficiente de variación del percentil 5 (CV_{P5}). En el grupo tratado el valor del CV_{P5} de la zona lejana fue significativamente mayor que el de la zona limítrofe ($17,5 \pm 5,6$ vs. $12,9 \pm 3,7$ %, $p < 0,05$). En cuanto al grupo control y al grupo falso operado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas zonas. Asimismo, los valores del CV_{P5} de la zona limítrofe y de la zona lejana no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales.

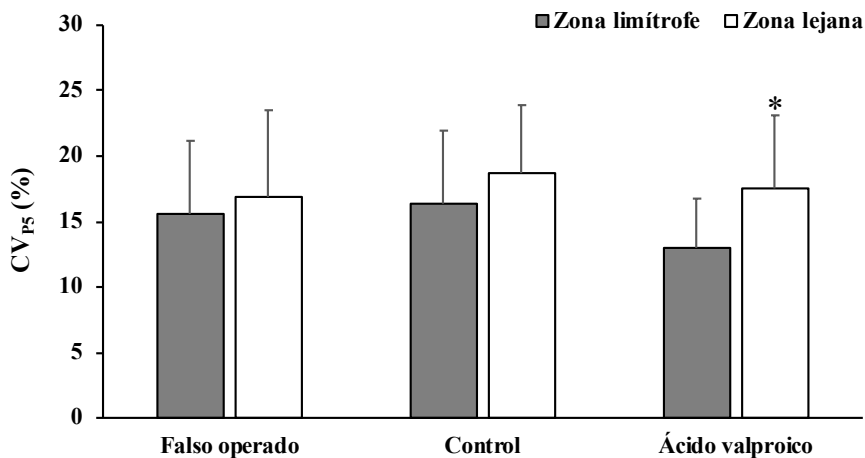


Figura 3.11: Coeficiente de variación del percentil 5 (CV_{P5}) analizado en la zona limítrofe y en la zona lejana. Se representan los valores medios \pm DE en los grupos experimentales falso operado ($n=15$), control ($n=22$) y tratado con ácido valproico ($n=10$). * $p < 0,05$ respecto a la zona limítrofe del grupo tratado con ácido valproico.

3.4.2.4. Coeficiente de variación de la frecuencia dominante

A partir de los resultados obtenidos de la frecuencia dominante, y sus correspondientes medias y desviaciones estándar, se calculó el coeficiente de variación de la frecuencia dominante (CV_{FD}), como medida de la heterogeneidad electrofisiológica miocárdica (figura 3.12).

3. Resultados

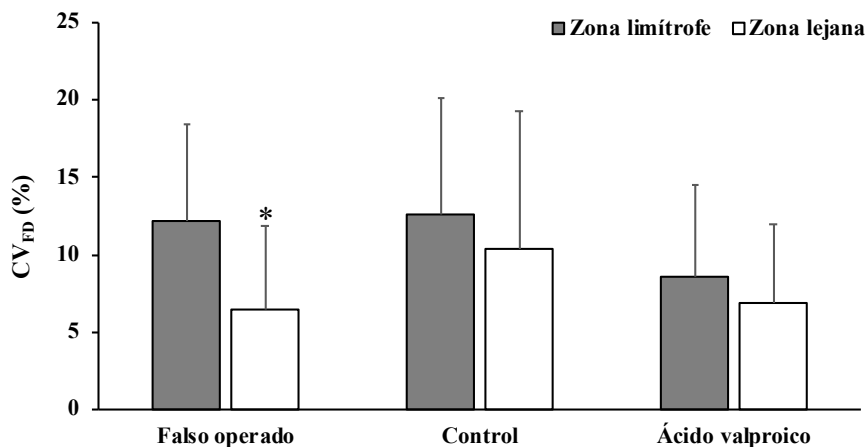


Figura 3.12: Coeficiente de variación de la frecuencia dominante (CV_{FD}), analizado en la zona límite y en la zona lejana. Se representan los valores medios \pm DE en los grupos falso operado ($n=15$), control ($n=22$) y tratado con ácido valproico ($n=10$). * $p<0,05$ respecto a zona límite del grupo falso operado.

En el grupo falso operado el valor de este parámetro en la zona “límite” fue significativamente mayor respecto a la zona lejana ($12,2 \pm 5,3$ vs. $6,5 \pm 5,3$ %, $p<0,05$). En el caso de los grupos control y tratado no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas zonas. Asimismo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cada una de las zonas al comparar los distintos grupos experimentales.

3.4.2.5. Concentración espectral

En la figura 3.13 se presentan los resultados correspondientes a la concentración espectral analizada en los tres grupos experimentales tanto en la zona límite como en la zona lejana. En el grupo falso operado la concentración espectral de la zona “límite” fue significativamente menor respecto a la zona lejana ($22 \pm 5,3$ vs. $28,7 \pm 13$ %, $p<0,05$). Tanto en el grupo control como en el grupo tratado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas zonas.

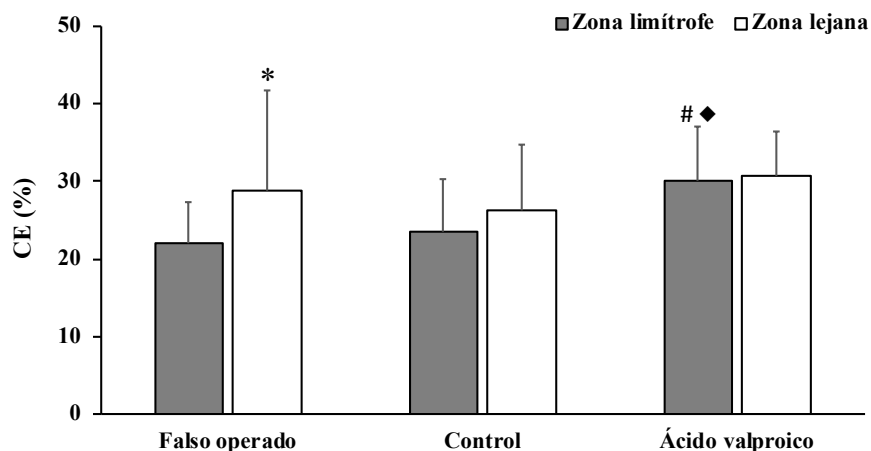


Figura 3.13: Concentración espectral (CE) medida en la zona limítrofe y en la zona lejana de los grupos experimentales falso operado (n=15), control (n=22) y tratado con ácido valproico (n=10). Se representan los valores medios \pm DE. * $p < 0,05$ respecto a zona limítrofe del grupo falso operado. # $p < 0,05$ respecto a la zona limítrofe del grupo falso operado. ♦ $p < 0,05$ respecto a la zona limítrofe del grupo control.

Respecto a la comparación del valor de la concentración espectral en la zona limítrofe de los distintos grupos experimentales, el valor de este parámetro fue mayor en el grupo tratado ($30,1 \pm 6,8 \%$) que en el grupo control ($23,6 \pm 6,7 \%$ $p < 0,05$) y que en el grupo falso operado ($22 \pm 5,3 \%$ $p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el valor de la concentración espectral de la zona lejana entre los distintos grupos experimentales.

3. Resultados

3.4.3. Análisis de la inducibilidad de la fibrilación ventricular

A continuación, se presentan los resultados correspondientes a la capacidad para desencadenar la fibrilación ventricular mediante la aplicación del TEEV independientemente del número de extraestímulos aplicados y del ciclo del tren base de estimulación. En la figura 3.14 se muestran los porcentajes de casos en los que se ha desencadenado la FV aplicando el test del extraestímulo ventricular en cada uno de los grupos experimentales. Se observó una asociación estadísticamente significativa entre el grupo experimental y la inducibilidad de fibrilación ventricular ($\chi^2=7,392$; $p=0,025$). Al realizar la comparación entre los distintos grupos experimentales, el porcentaje de casos en los que se desencadena la fibrilación ventricular en el caso del grupo tratado fue significativamente menor que en el grupo control (40% vs. 59%; $\chi^2=6,481$; $p=0,011$).

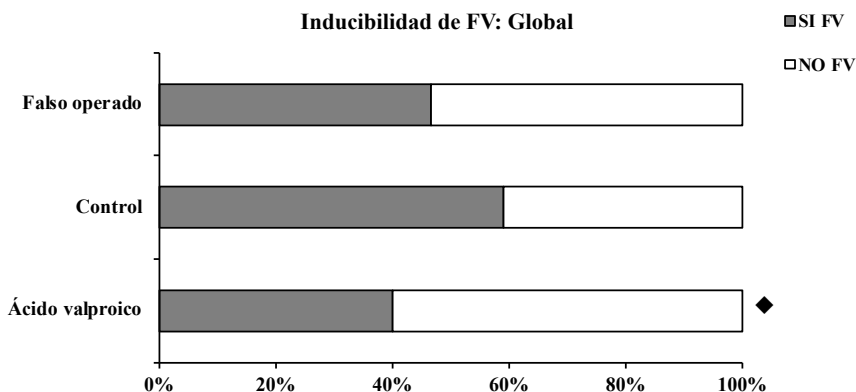


Figura 3.14: Inducibilidad de la fibrilación ventricular mediante la aplicación del test del extraestímulo ventricular. Se analiza la asociación entre la pertenencia a los grupos experimentales falso operado (n=15), control (n=22) y tratado con ácido valproico (n=10), y el desencadenamiento o no de la FV. \blacklozenge $p<0,05$ respecto al grupo infarto control.

Al estudiar la asociación entre los distintos grupos experimentales y la inducibilidad de FV con la aplicación del TEEV para cada ciclo básico de estimulación (250 ms y 150 ms). Se observa una asociación estadísticamente significativa entre la pertenencia al grupo experimental y el desencadenamiento de la FV con un ciclo de estimulación u otro ($\chi^2=7,825$; $p=0,020$). Así, en el grupo control el porcentaje de casos en los que se desencadena la fibrilación ventricular con el ciclo de estimulación de 250 ms es mayor que en el grupo falso operado (30,8% vs. 14,3%; $\chi^2=6,878$; $p=0,009$) (figura 3.15).

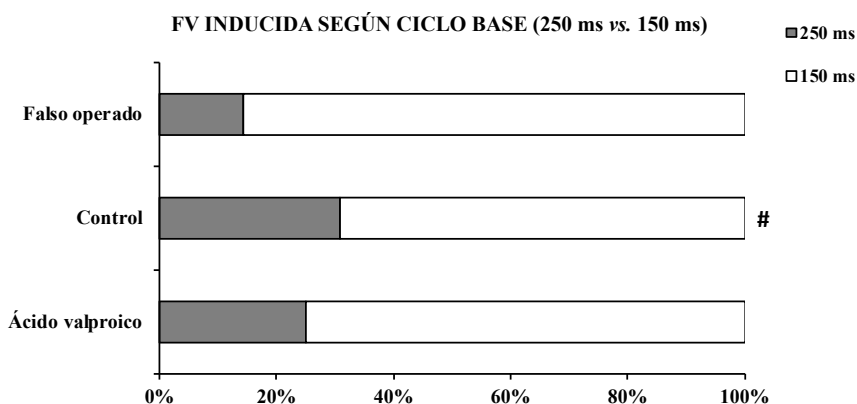


Figura 3.15: Inducción de la fibrilación ventricular mediante la aplicación del test del extraestímulo ventricular con un ciclo base de 250 ms o 150 ms. Se analiza la asociación entre la pertenencia de los grupos experimentales falso operado ($n=15$), control ($n=22$) y tratado con ácido valproico ($n=10$), y el desencadenamiento de la FV con un ciclo base u otro. # $p<0,05$ respecto al grupo falso operado.

En la figura 3.16 se muestran los resultados correspondientes al análisis del número de extraestímulos necesarios para desencadenar la fibrilación ventricular.

3. Resultados

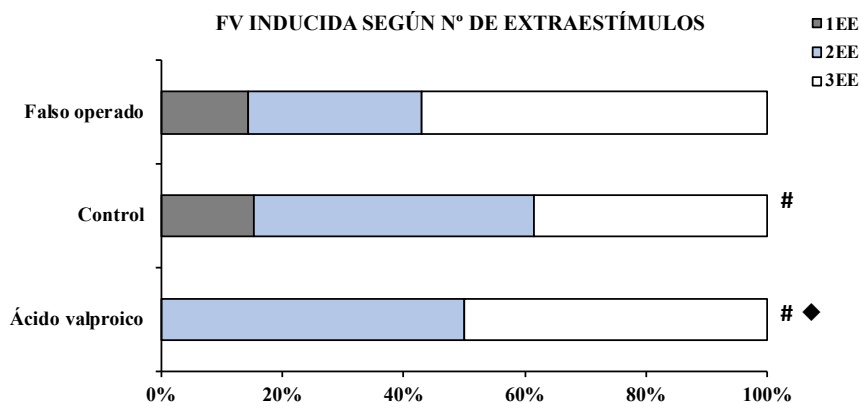


Figura 3.16: Inducción de fibrilación ventricular con 1, 2 y 3 extraestímulos (EE). Se analiza la asociación entre la pertenencia a los grupos experimentales falso operado (n=15), control (n=22) y tratado con ácido valproico (n=10), y el desencadenamiento de la FV con 1, 2, o 3 extraestímulos. # p<0,05 respecto al grupo falso operado. ◆ p<0,05 respecto al grupo control.

Se observa una asociación estadísticamente significativa entre la pertenencia al grupo experimental y el número de extraestímulos necesario para desencadenar la FV ($\chi^2=23,903$; $p=0,000$). El grupo control requiere menor número de extraestímulos para desencadenar la FV que el grupo falso operado. Así, el porcentaje de casos en los que se induce la FV con 3EE en el grupo falso operado es el 57%, con 2EE el 29% y con 1EE el 14%, mientras que en el grupo control dichos porcentajes son respectivamente 38%, 46% y 15%. Las diferencias entre ambos grupos son significativas ($\chi^2=7,263$; $p<0,005$). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y tratado. En el grupo control el porcentaje de casos en los que se induce la FV con 1, 2 y 3 EE es respectivamente 15%, 46% y 38%, mientras que en el grupo tratado la FV se induce con 2 y 3 EE, siendo el porcentaje del 50% en ambos casos ($\chi^2=16,526$; $p<0,005$). También, se han observado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado (2EE 50% y 3EE 50%) y el grupo falso operado ($\chi^2=20,040$; $p<0,005$).

3.4.4. Relación entre la inducibilidad de FV y la refractariedad

En primer lugar, se ha analizado la relación entre el periodo refractario efectivo o funcional mínimo y la inducibilidad de la arritmia.

La figura 3.17 muestra los resultados obtenidos al comparar el mínimo PRE y PRF de los casos en los que se desencadenó la FV respecto a los casos en los que no se desencadenó, independientemente de la pertenencia al grupo experimental. Se observó que el mínimo PRE de los casos en los que se desencadenó la FV fue significativamente menor que el de los casos que no fibrilaron (82 ± 15 vs. 92 ± 18 ms, $p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores correspondientes al mínimo periodo refractario funcional.

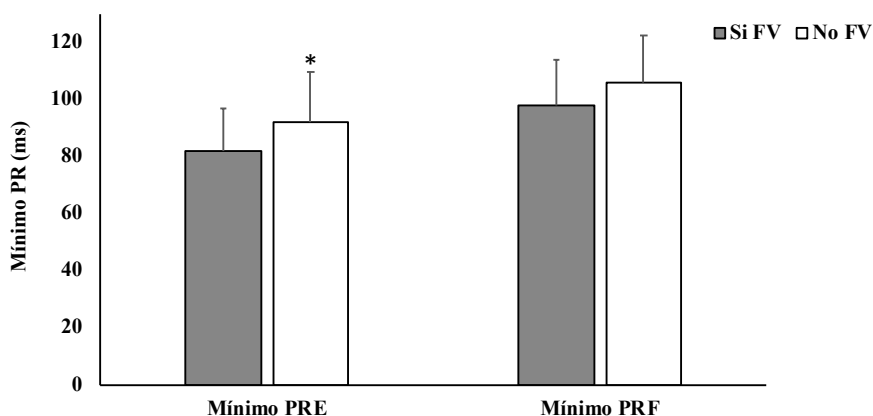


Figura 3.17: Mínimo periodo refractario efectivo (PRE) y funcional (PRF) obtenido en los casos en los que se desencadenó la FV ($n=24$) y en los casos en los que no se desencadenó la arritmia ($n=23$). * $p < 0,05$ respecto a los casos en los que se desencadena la arritmia.

La figura 3.18 muestra el mínimo PRE obtenido en los tres grupos experimentales en los casos en los que se desencadena la FV y en aquellos en los que no se induce. En el grupo tratado el mínimo PRE de los casos en los que se desencadenó la FV fue significativamente menor que el de los

3. Resultados

casos en los que no se desencadenó la arritmia (80 ± 4 vs. 99 ± 11 ms, $p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos control y falso operado. Al comparar entre sí los distintos grupos experimentales no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

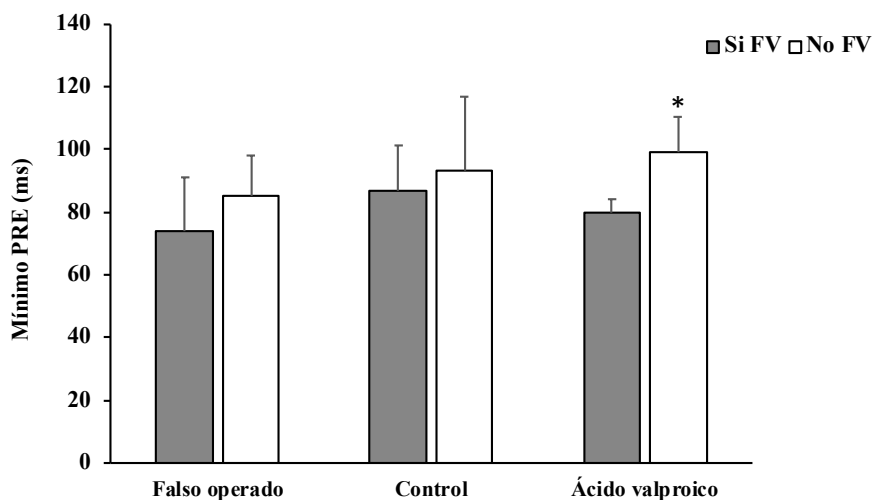


Figura 3.18: Mínimo periodo refractario efectivo analizado en los casos en los que se desencadenó la FV y en los que no se desencadenó la arritmia. Se representan los valores medios \pm DE en los grupos falso operado ($n=15$), control ($n=22$) y tratado con ácido valproico ($n=10$). * $p < 0,05$ respecto a los casos en los que se desencadena la fibrilación ventricular.

En cuanto a los resultados sobre el mínimo PRF (figura 3.19), en el grupo tratado el mínimo PRF de los casos en los que se desencadenó la FV también fue significativamente menor que el de los casos en los que no se desencadenó la arritmia (97 ± 9 vs. 112 ± 10 ms, $p < 0,05$).

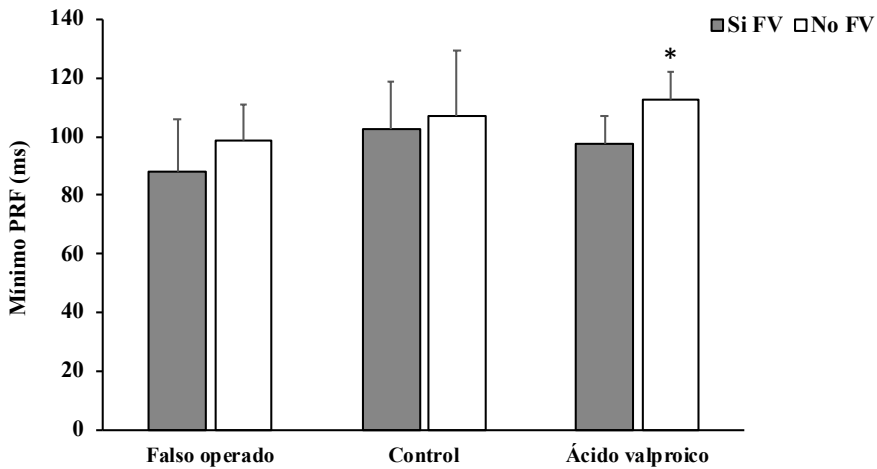


Figura 3.19: Mínimo periodo refractario funcional analizado en los casos en los que se desencadenó la FV y en los que no se desencadenó la arritmia. Se representan los valores medios \pm DE en los grupos falso operado (n=15), control (n=22) y tratado con ácido valproico (n=10). * $p < 0,05$ respecto a los casos en los que se desencadena la fibrilación ventricular.

3.4.5. Relación entre la inducibilidad de arritmias y la heterogeneidad electrofisiológica

En primer lugar, se ha analizado el coeficiente de variación de los periodos refractario efectivo (CV_{PRE}) y funcional (CV_{PRE}). En la figura 3.20 se observa que el CV del PRE de los casos en los que se desencadenó la FV fue significativamente mayor que en los casos en los que no se indujo la arritmia (12 ± 5 vs. 7 ± 3 ms, $p < 0,05$). El coeficiente de variación del PRF también fue significativamente mayor en los casos que fibrilaron (9 ± 4 vs. 5 ± 2 ms, $p < 0,05$).

3. Resultados

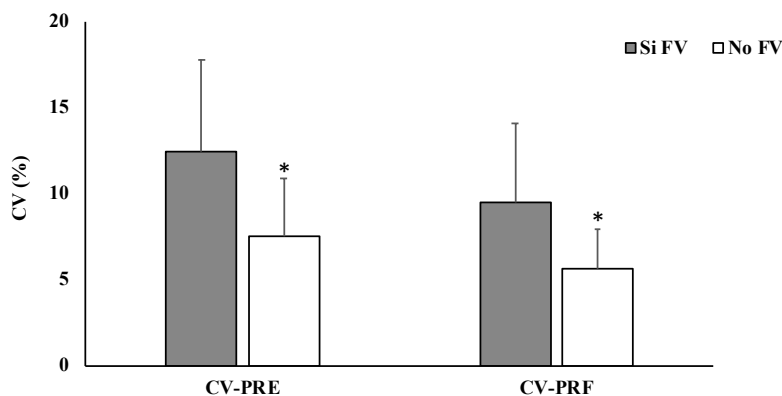


Figura 3.20: Coeficiente de variación del periodo refractario efectivo (PRE) y del funcional (PRF) obtenido en los casos en los que se desencadenó la FV (n=24) y en los casos en los que no se desencadenó la arritmia (n=23). * $p < 0,05$ respecto a los casos en los que se desencadenó la arritmia.

La figura 3.21 muestra los resultados correspondientes a los tres grupos experimentales analizados por separado. En el grupo control el valor del CV_{PRE} de los casos en los que se desencadenó la FV fue significativamente mayor que el de los casos en los que no se desencadenó la arritmia (14 ± 6 vs. 8 ± 4 %, $p < 0,05$). También en el grupo falso operado el valor del CV_{PRE} de los casos en los que se desencadenó la FV fue significativamente mayor que el de los casos en los que no se desencadenó la arritmia (12 ± 5 vs. 8 ± 3 %, $p = 0,05$). En cuanto al grupo tratado, las diferencias no alcanzaron significación estadística. Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre sí los distintos grupos experimentales.

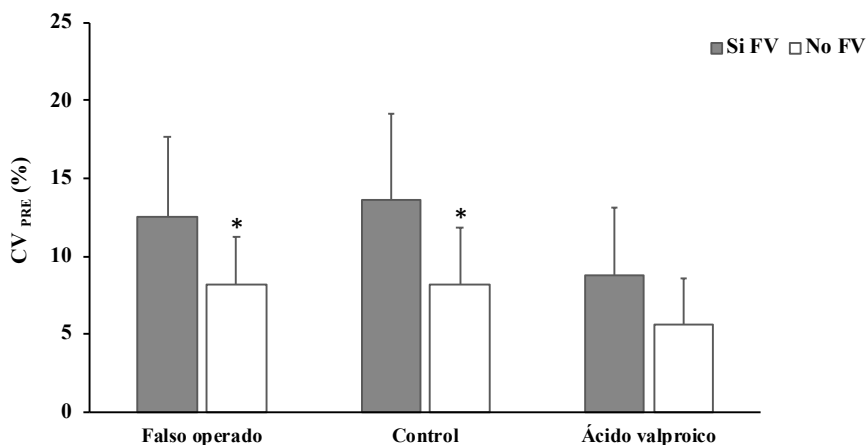


Figura 3.21: Coeficiente de variación del periodo refractario efectivo (CV_{PRE}) analizado en los casos en los que se desencadenó la FV y en los que no se desencadenó la arritmia. Se representan los valores medios \pm DE en los grupos falso operado ($n=15$), control ($n=22$) y tratado con ácido valproico ($n=10$). * $p<0,05$ respecto a los casos en los que se desencadenó la fibrilación ventricular.

En cuanto a los resultados correspondientes al CV_{PRF} (figura 3.22), en el grupo control el valor del CV_{PRF} de los casos en los que se desencadenó la FV también fue significativamente mayor respecto al de los casos en los que no se desencadenó la arritmia (11 ± 5 vs. 6 ± 3 %, $p<0,05$). En cuanto a los grupos falso operado y tratado, no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre sí los distintos grupos experimentales.

3. Resultados

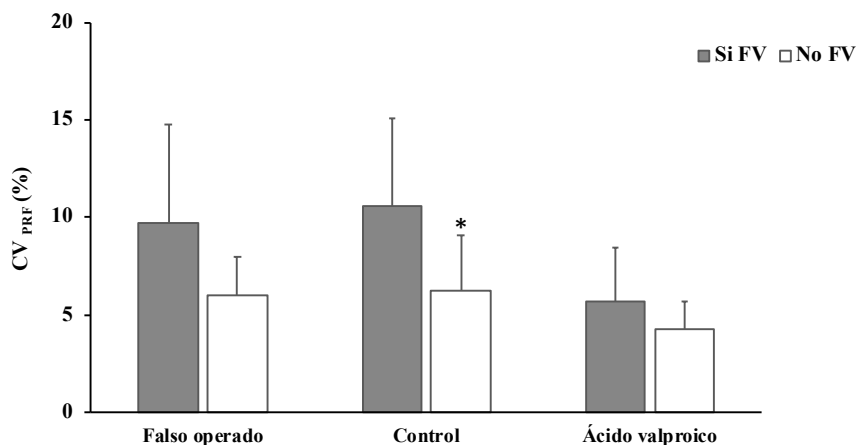


Figura 3.22: Coeficiente de variación del periodo refractario funcional (CV_{PRF}) analizado en los casos en los que se desencadenó la FV y en aquellos en los que no se desencadenó la arritmia. Se representan los valores medios \pm DE en los grupos falso operado ($n=15$), control ($n=22$) y tratado con ácido valproico ($n=10$). * $p<0,05$ respecto a los casos en los que se desencadenó la fibrilación ventricular del grupo control.

3.4.6. Análisis bivariado en relación con la inducibilidad de la FV

La tabla 3.5 muestra el análisis de regresión lineal realizado para establecer las correlaciones entre la inducibilidad de la FV y los parámetros PRE mínimo, PRF mínimo, CV_{PRE} , CV_{PRF} , FE (semana 2 y 5), DVId (semana 2 y 5), DVIs (semana 2 y 5) y tamaño del infarto. Los coeficientes de correlación fueron significativos en el caso de los parámetros electrofisiológicos PRE mínimo, CV_{PRE} y CV_{PRF} , pero no en el caso de PRF mínimo, FE, DVId, DVIs y tamaño del infarto.

	R	Constante	Coefficiente	p	eee
Inducibilidad FV					
PRE mínimo	0,309	1,314	-0,009	0,035	0,486
PRF mínimo	0,242	1,251	-0,007	0,101	0,496
CV _{PRE}	0,493	0,050	-0,003	0,001	0,445
CV _{PRF}	0,475	0,047	0,059	0,001	0,450
FE _{S2}	0,013	0,574	-0,001	0,934	0,511
FE _{S5}	0,027	0,423	0,002	0,874	0,511
DVI _{S2}	0,103	0,906	-0,026	0,400	0,509
DVI _{S5}	0,135	1,122	-0,036	0,420	0,506
DVI _{SS2}	0,067	0,669	-0,018	0,664	0,510
DVI _{SS5}	0,111	0,857	-0,033	0,509	0,508
Tamaño infarto	0,150	0,429	0,004	0,316	0,505

Tabla 3.5: Regresión lineal para el análisis de la correlación de la inducibilidad de la FV con los parámetros estudiados. S2: semana 2; S5: semana 5; eee: error estándar de estimación.

3.4.7. Análisis multivariado en relación con la inducibilidad de la FV

Al efectuar el análisis de regresión lineal múltiple tomando la inducibilidad de la FV como variable dependiente y los parámetros mencionados en el apartado 3.4.6, en los que se obtuvo una correlación cuya significancia fue inferior a 0,1, como variables independientes, el modelo solo identificó el CV_{PRE} como variable independiente (R=0,483; p=0,001; error estándar de la estimación=0,448) (tabla 3.6).

3. Resultados

	R	Constante	Coficiente	p	eee
CV_{PRE}	0,483	0,001	0,048	0,001	0,448
PRE	-	-	.	0,492	-
PRF	-	-	-	0,470	-
CV_{PRF}	-	-	-	0,852	-
Tamaño infarto	-	-	-	0,365	-

Tabla 3.6: Resultados del análisis multivariado efectuado tomando como variable dependiente la inducibilidad de la FV y como variables independientes el PRE mínimo, PRF mínimo, CV_{PRE} y CV_{PRF} . eee: error estándar de estimación.

Capítulo 4

DISCUSIÓN

En la presente tesis se ha investigado en un modelo de infarto agudo de miocardio en conejos el efecto de la administración de un inhibidor de las enzimas desacetilasas de histonas, sobre las propiedades electrofisiológicas intrínsecas del miocardio ventricular relacionadas con la instauración de arritmias letales y sobre su inducibilidad. Asimismo, se ha estudiado el efecto del inhibidor de las desacetilasas de histonas sobre la magnitud de la lesión isquémica. Para poder llevar a cabo este estudio, uno de los objetivos principales de la presente tesis doctoral ha sido desarrollar y caracterizar un modelo crónico de infarto agudo de miocardio en conejo. Para la validación del modelo se ha empleado el análisis de marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica, las troponinas T, analizados en la fase precoz, así como la monitorización ecocardiográfica y la determinación del tamaño del infarto mediante técnicas de tinción histológica macroscópica. Los resultados de la investigación han demostrado un efecto protector del inhibidor de las enzimas desacetilasas de histonas a diferentes niveles.

4.1. Consideraciones relativas a los materiales y métodos empleados

4.1.1. Respecto a la idoneidad de la especie seleccionada

Los modelos animales experimentales son esenciales en investigación para reducir la brecha que existe entre el conocimiento de las enfermedades y los procesos subyacentes involucrados, proporcionando así una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad. La utilización de modelos animales de experimentación adecuados permite comprender los mecanismos involucrados y obtener así nuevos enfoques terapéuticos, preventivos y diagnósticos, en este caso en el ámbito de la patología cardiovascular (Kumar *et al.*, 2016). Puesto que ningún modelo recrea perfectamente la patología humana, para su elección es necesario considerar una serie de factores como son el coste, el equipamiento y la infraestructura que requieren, el personal especializado, la facilidad de

4. Discusión

manejo del animal, y la supervivencia (Hacker, 2018). Además, se deben tener en cuenta las diferencias que presentan los modelos animales respecto al humano en cuanto al tamaño, el tejido muscular, la frecuencia cardiaca y la actividad eléctrica. El conejo es un animal apropiado para el estudio de los procesos asociados con el daño miocárdico producido por la isquemia/reperfusión (Feng *et al.*, 2014). Presenta unas condiciones de alojamiento y coste razonables en comparación con animales de mayor tamaño como el cerdo. El tamaño del corazón es adecuado puesto que no dificulta excesivamente los procedimientos quirúrgicos y la microcirculación coronaria es similar a la del cerdo, la cual, a su vez, es parecida a la de los humanos, a diferencia de los modelos caninos, en los que la circulación coronaria colateral es más elevada (Maxwell *et al.*, 1987; Allahwala *et al.*, 2019). En el conejo, la anatomía del corazón, las ramas coronarias, su recorrido y la circulación colateral son similares a la de los humanos (Tang *et al.*, 2018). Básicamente, la anatomía de las arterias coronarias del conejo consiste en una arteria coronaria principal izquierda constante y un predominio de la arteria coronaria izquierda o derecha en función de si la arteria descendente posterior tiene su origen en la arteria coronaria circunfleja o en la arteria coronaria derecha. La coronaria izquierda se divide en descendente anterior (o interventricular) y circunfleja. La arteria descendente anterior recorre el surco interventricular anterior y continúa hasta el ápex del corazón. Dicha arteria irriga la parte anterior del tabique con ramas septales y la pared anterior del ventrículo izquierdo con ramas diagonales. Las arterias coronarias circunfleja y derecha irrigan la pared lateral del ventrículo izquierdo y derecho respectivamente (Isorni *et al.*, 2015).

Por otra parte, las características electrofisiológicas de los cardiomiocitos de conejo están más próximas a las de los humanos que las de los roedores. Las complicaciones arrítmicas que tienen lugar durante la

fase de seguimiento inicial, en el modelo experimental son menos frecuentes que cuando se utilizan animales de mayor tamaño (Lukács *et al.*, 2012). La fisiología cardiovascular de los conejos no se aleja excesivamente de la de los humanos en cuanto a los patrones del manejo del calcio relacionados con la contractilidad y las isoformas de la cadena pesada de miosina (Isorni *et al.*, 2015). El potencial de acción de los cardiomiocitos de conejo posee una morfología en pico y cúpula y una duración de 200-300 ms aproximadamente. Además, la repolarización implica corrientes iónicas de K^+ (IK^+) conocidas como “rectificadores retardados” rápido (IK_f) y lento (IK_s), cuya expresión es similar en el miocardio ventricular de conejos y humanos. Sin embargo, en el miocardio ventricular de modelos murinos (rata o ratón) el potencial de acción posee una duración muy corta, alrededor de 50 ms, y una morfología triangular, además de carecer de corrientes iónicas de repolarización que están presentes en el ventrículo humano es decir IK_f e IK_s (Nerbonne y Kass, 2005; Arias-Mutis *et al.*, 2017). En relación con el manejo del calcio sarcolémico e intracelular también existen diferencias entre especies con respecto al papel de las corrientes de calcio. En estado normal la salida de calcio por el intercambiador $Na^+ - Ca^{2+}$ (NCX) es aproximadamente igual a la entrada debida a la corriente de calcio tipo L ($ICaL$). En los seres humanos y en los conejos la contribución de $ICaL$ y del intercambiador NCX en el equilibrio del flujo de calcio y la extrusión de este durante los ciclos cardiacos, es mayor que en el ratón y la rata en los que, además, juega un papel predominante el retículo sarcoplásmico (RS) y la actividad de la RS calcio ATPasa (SERCA2), cuya participación en la recaptación de calcio, es mayor (Edwards y Louch, 2017). El equilibrio entre la actividad de SERCA2 y el intercambiador NCX influye en la liberación espontánea de Ca^{2+} así como en la formación de ondas de calcio y postdespolarizaciones. La susceptibilidad a la formación de postdespolarizaciones tempranas y tardías varía en función de la reserva de repolarización y de factores como

4. Discusión

la sensibilidad del receptor de ryanodina, las características de los flujos celulares de Ca^{2+} , y la frecuencia cardiaca intrínseca entre otros parámetros. Las diferencias en el manejo del calcio, la restitución del potencial de acción y el tamaño del corazón determinan una menor susceptibilidad a los fenómenos de alternancia eléctrica en aquellos modelos experimentales donde se utilizan rata y ratón (Edwards y Louch, 2017).

Para el presente trabajo ha sido muy importante disponer de un modelo experimental que permita el estudio de arritmias como la fibrilación ventricular. En el caso del corazón de conejo, su mayor masa ventricular y la menor frecuencia cardiaca que en el modelo murino, hacen que sea posible la inducción de la arritmia y que ésta se mantenga una vez instaurada (Chorro *et al.*, 2009; Galappaththige *et al.*, 2019), a diferencia de los corazones de pequeños roedores en los que la inducción y el mantenimiento de la FV son más difíciles de conseguir al poseer un menor tamaño (Panfilov, 2006; Edwards y Louch, 2017).

Por todo lo comentado en estas líneas, el conejo es un modelo que se utiliza normalmente para estudios electrofisiológicos. No obstante, a pesar de las similitudes, a la hora de la extrapolación de los resultados al ser humano se deben tener en cuenta las diferencias entre especies (Janse *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 2010).

Para la realización del estudio electrofisiológico se ha utilizado una preparación experimental basada en el modelo de corazón aislado de Langendorff, y en este sentido otra de las ventajas que presenta el corazón de conejo es que permite su perfusión con líquidos de fácil disponibilidad y preparación como es la solución de Tyrode, a diferencia del corazón de animales de mayor tamaño que requieren sangre para su perfusión. En cuanto a las técnicas de extracción del corazón, para su posterior aislamiento, el conejo permite una fácil manipulación a diferencia de

animales más grandes como el perro o el cerdo, los cuales requieren manipulaciones adicionales.

4.1.2. Respecto a la metodología para la producción del infarto agudo de miocardio

Los modelos experimentales *in vivo* se utilizan cada vez más en estudios de isquemia miocárdica debido a sus numerosas similitudes, en el caso de ciertas especies, con los humanos. Además, proporcionan un enfoque sistémico para comprender el proceso de la enfermedad, el cual no se puede reproducir completamente empleando modelos *in vitro* (Kumar *et al.*, 2016). Existe una amplia variedad de técnicas experimentales, procedimientos quirúrgicos, farmacológicos o eléctricos, para modificar o interrumpir el flujo coronario con el fin de inducir el daño miocárdico que genera el infarto de miocardio (Feng *et al.*, 2014; Bøtker *et al.*, 2018; Lindsey *et al.*, 2018).

En pequeños animales, como la rata y el ratón, el desarrollo del infarto de miocardio se puede conseguir mediante procedimientos quirúrgicos con la ligadura de una arteria coronaria (Ríos-Navarro *et al.*, 2020-A). Además, los modelos de ratón permiten disponer de modificaciones genéticas, como modelos *knockout* y transgénicos, los cuales facilitan el estudio de procesos como la arterioesclerosis, que es un factor clave, responsable de la progresión de la cardiopatía isquémica. También se han utilizado modelos en los que se induce el infarto mediante el uso de fármacos como el isoproterenol, el cual produce un patrón de necrosis isquémica similar al humano puesto que produce una necrosis máxima en la región subendocárdica ventricular y en el tabique interventricular (Kumar *et al.*, 2016). A pesar de ser un modelo en el que se utilizan especies como el ratón o el conejo, frecuentemente para este modelo es preferible el uso de ratas (Meeran *et al.*, 2019).

4. Discusión

Entre los modelos de isquemia y reperfusión en animales grandes, se diferencian aquellos en los que la oclusión coronaria se realiza mediante procedimiento quirúrgico, tras una toracotomía o esternotomía, por lo tanto, a tórax abierto, y aquellos que no requieren procedimiento quirúrgico, sino que la oclusión coronaria se lleva a cabo mediante técnicas basadas en el cateterismo (modelos a tórax cerrado). Los modelos con el tórax abierto permiten el control preciso de la localización de la oclusión coronaria, así como la evaluación visual directa de la función contráctil del corazón (Kumar *et al.*, 2016). En este tipo de modelos la oclusión coronaria puede realizarse mediante ligadura de la arteria coronaria descendente anterior o de la arteria coronaria circunfleja (Bøtker *et al.*, 2018). También se han realizado modelos de oclusión coronaria mediante la implantación de un constrictor ameroide (Keeran *et al.*, 2017) o mediante la utilización de un oclusor hidráulico (Kim *et al.*, 2011).

En referencia a los modelos con tórax cerrado, en ellos se suelen utilizar especies de animales grandes como el cerdo, el perro o la oveja entre otros, puesto que debido a su tamaño las técnicas basadas en el cateterismo se desarrollan con mayor facilidad. En este tipo de modelos el infarto de miocardio puede producirse mediante una oclusión coronaria de forma temporal o permanente. La oclusión coronaria puede realizarse por diversos métodos entre los que se encuentran, la introducción de un catéter con balón hinchable en la parte distal, dentro de la arteria coronaria (Bodí *et al.*, 2010; Ríos-Navarro *et al.*, 2020-B), el uso de técnicas percutáneas basadas en el principio de embolización mediante el despliegue de una bobina de platino o acero inoxidable (Gálvez-Montón *et al.*, 2014), la lesión eléctrica endotelial, el implante de anillos inflables, de *stents*, o la administración de fármacos vasoconstrictores, entre otros procedimientos (Kumar *et al.*, 2016; Allahwala *et al.*, 2019).

Se debe tener en cuenta que las técnicas anteriormente citadas, en general, no reproducen fielmente los mecanismos de oclusión presentes en el ser humano, como son los relacionados con la arterioesclerosis, el desarrollo de lesiones coronarias y la rotura de placas; sin embargo, pueden utilizarse para la inducción de oclusiones agudas y crónicas para el estudio de los procesos desencadenados por la isquemia y reperfusión.

En el modelo experimental desarrollado en el presente trabajo se ha seleccionado, para su oclusión, la arteria coronaria circunfleja izquierda, puesto que, como han señalado otros autores, la arteria coronaria descendente anterior es de calibre reducido en conejos y el ápex es irrigado por la arteria coronaria circunfleja. Además, esta arteria generalmente puede verse de modo claro en la superficie del ventrículo izquierdo anterolateral y su oclusión hace que aproximadamente un tercio del ventrículo acuse el proceso isquémico (Bøtker *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2017). En cuanto a la duración de la oclusión coronaria, ésta debe ser suficiente para que se produzcan daños irreversibles y pueda tener lugar el infarto (Lindsey *et al.*, 2018). En el presente modelo, la ligadura de la arteria coronaria circunfleja se mantuvo durante una hora, dando como resultado un área de tejido infartado macroscópicamente observable. Un aspecto importante que se debe tener en cuenta al estudiar los procesos asociados a la isquemia junto con aquellos asociados a la reperfusión es cómo restaurar el flujo coronario tras el periodo de isquemia. En el presente modelo, la realización de una esternotomía media asegura la correcta visualización de la arteria coronaria circunfleja, la selección adecuada del área de la ligadura, así como la observación directa del área subsidiaria y su función durante el periodo isquémico e inmediatamente después la retirada de la ligadura y la consiguiente restauración del flujo sanguíneo (Genovés *et al.*, 2020).

4. Discusión

4.1.3. Respeto al cuidado de los animales

La experimentación con animales está sujeta a regulaciones precisas y mecanismos de control destinados a prevenir el sufrimiento de los animales. El cumplimiento de los requisitos establecidos empieza con la aprobación de los protocolos experimentales por parte de los comités de ética correspondientes, que incluye el análisis de los objetivos del estudio, su utilidad para profundizar en el conocimiento sobre la fisiopatología y avanzar en el diagnóstico, tratamiento, y prevención de las enfermedades, así como la idoneidad del equipo, las técnicas y los métodos propuestos, incluidos los procedimientos de anestesia y/o sedación, los procedimientos quirúrgicos, los cuidados tras la intervención y las condiciones de alojamiento y seguimiento (Robinson *et al.*, 2019). En el modelo empleado en el presente trabajo se siguió la normativa vigente (Real Decreto 53/2013) y se desarrolló un protocolo de cuidados pre y postoperatorios en el que se incluyeron el control del dolor, la sedación y oxigenación adecuadas, asepsia, monitorización de constantes vitales, fluidoterapia y control de la temperatura. Así mismo los cuidados que se aplicaron tras la intervención quirúrgica consideraron la prevención de las molestias y el dolor, el control de las infecciones y la correcta hidratación y nutrición de los animales, tanto en el periodo inmediato como en la fase crónica. Además, en los procedimientos con animales, se deben establecer una serie de criterios de punto final para evitar el sufrimiento y/o dolor de los animales y preservar en todo momento el bienestar animal. Por ello, en nuestro caso todos aquellos animales que presentaron signos de posible sufrimiento, dolor o estrés donde se viese alterado el bienestar animal, siguiendo dichos criterios de punto final y bajo la supervisión de la veterinaria responsable del centro, fueron sometidos a eutanasia (Genovés *et al.*, 2020).

4.1.4. Respecto al sistema de perfusión de Langendorff

En el presente trabajo se ha utilizado una preparación de corazón aislado tipo Langendorff que ha supuesto uno de los mayores avances en relación con la preparación de corazón aislado. Langendorff en 1895, realizó una modificación clave del modelo inicial de corazón aislado de rana (realizado por Carl Ludwig en 1846 y Elias Cyon en 1866, citados por Riascos *et al.*, 2004), mediante el uso de corazones de mamíferos como conejos, perros y principalmente gatos, 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 (para revisión ver: Zimmer, 1998; Riascos *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2012). Gracias a este avance, se logró que el corazón perfundido continuara latiendo. No obstante, esta preparación excluye una carga contra la que el corazón ha de vencer, esto es, se trata de un corazón en el que el ventrículo izquierdo no ejecuta trabajo externo. Para añadir una poscarga James Neely y Howard Morgan en 1967, realizaron una importante modificación del modelo, describiendo una preparación de corazón aislado de rata, en la que se realizaba un trabajo mecánico fisiológicamente válido (Neely *et al.*, 1967; citado por Liao *et al.*, 2012).

El desarrollo de esta técnica ha permitido que múltiples grupos de investigación hayan realizado trabajos relacionados con distintos aspectos de la electrofisiología cardíaca. Este ha sido el método que se ha seguido para la realización del presente trabajo y de otros trabajos de investigación en los cuales mediante sistemas de cartografía eléctrica, y más recientemente mediante sistemas de cartografía óptica, se han analizado las diferentes propiedades electrofisiológicas en el miocardio sometido a diversos 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

4. Discusión

diferentes fármacos (v.gr.: del Canto *et al.*, 2018; Such-Miquel *et al.*, 2018), e intervenciones como son el síndrome metabólico (Calvo *et al.*, 2019) y el efecto que desencadena la realización de protocolos de ejercicio físico crónico (Zarzoso *et al.*, 2012, Such-Miquel *et al.*, 2018).

La técnica de Langendorff, destaca por 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 ser condiciones límite, muy difícilmente realizables en un estudio *in vivo*, tal como sucede en un paro cardíaco o durante la instauración de arritmias letales como la fibrilación ventricular (Riascos *et al.*, 2004).

El hecho de utilizar este tipo de preparación con solamente una ligera precarga ventricular derecha y sin poscarga, permite asegurar que las diferencias observadas entre los grupos experimentales no pueden atribuirse a diferencias en el trabajo cardíaco, sino al efecto de la intervención, en nuestro caso el efecto del fármaco ácido valproico sobre el infarto de miocardio.

No obstante, esta técnica requiere de un estricto control de la temperatura y de la presión de perfusión, con el objetivo de simular, al menos en parte, las condiciones fisiológicas lo más cercanas posible a la realidad.

En cuanto al desencadenamiento de la fibrilación ventricular, *in vivo*, como ocurre en el ser humano, ésta implica la abolición de la perfusión coronaria, la aparición de isquemia y el deterioro metabólico del miocardio, condiciones que por sí mismas modifican las características del proceso fibrilatorio (Chorro *et al.*, 2002). Por este motivo, es necesario el uso de

preparaciones experimentales, en las que se mantenga la perfusión coronaria constante durante la fibrilación ventricular para el mantenimiento de un estado metabólico adecuado durante la arritmia, dando lugar a condiciones experimentales estables y fácilmente reproducibles que permiten evaluar los efectos de distintas variables sobre el patrón fibrilatorio ventricular (Chorro *et al.*, 2000).

4.1.5. Respecto a la metodología empleada para la determinación de los parámetros electrofisiológicos

El estudio de la refractariedad miocárdica se ha realizado mediante la aplicación del test del extraestímulo ventricular con el que se han obtenido los periodos refractarios efectivo y funcional. La refractariedad ventricular también ha sido evaluada de modo indirecto a través del análisis espectral de la fibrilación ventricular inducida, que permite conocer la frecuencia dominante. Además, también se ha determinado el periodo refractario funcional durante la arritmia a través de su análisis en el dominio del tiempo y la obtención del percentil 5 de los intervalos VV. Este análisis en el dominio del tiempo permite obtener una estimación bastante real de la refractariedad en una situación en la que se excluye la estimulación externa, como ocurre al aplicar el TEEV. Por otro lado, se han analizado los coeficientes de variación de algunos de los parámetros citados, que, junto con la concentración espectral de la FV, aportan información sobre la heterogeneidad electrofisiológica miocárdica.

Para el estudio de la inducibilidad de la fibrilación ventricular, se ha aplicado el test del extraestímulo ventricular con dos ciclos de estimulación y hasta tres extraestímulos con el fin de “llevar” al miocardio ventricular a una situación más vulnerable en cada una de las cuatro zonas en las que se aplicó la estimulación.

4. Discusión

Al efectuar los análisis de los registros obtenidos durante la FV en los corazones con infarto hubo zonas en las que las señales presentaban bajo voltaje, simultaneidad absoluta de los trazados e identidad morfológica. La aparición de este tipo de registros indica que los electrodos se encuentran ubicados en el epicardio de la zona infartada y que detectan la actividad eléctrica de las zonas miocárdicas cercanas viables ya que el miocardio necrosado actúa como un conductor de volumen inespecífico o como un “cable” conductor. En estos casos se desestimó el uso de los trazados con las características citadas para el análisis de la señal fibrilatoria, aunque este tipo de registros aportaron información complementaria sobre la extensión del infarto.

4.1.6. Respecto a la metodología empleada para la evaluación del daño miocárdico

Para la evaluación del daño miocárdico se ha recurrido por una parte a la determinación de marcadores bioquímicos en plasma y por otra parte a la identificación del tejido necrosado mediante tinción macroscópica con sales de tetrazolio.

Respecto a los marcadores séricos de daño miocárdico, en el presente trabajo se ha determinado la concentración plasmática de troponina T. Aunque las pruebas bioquímicas de lesión miocárdica no informan directamente sobre la causa de la lesión, permiten inferir la existencia de lesiones incluso de escasa magnitud. Estas se pueden producir por diversos procesos fisiopatológicos como es el caso de las miocarditis, la acción de toxinas miocárdicas o el infarto de miocardio. El hecho de que la necrosis altere la integridad estructural del sarcolema origina una difusión desde el cardiomiocito hacia el líquido intersticial y desde éste hacia el torrente sanguíneo, de diversas sustancias. Entre los factores implicados en su mayor o menor rapidez de aparición en sangre se

encuentran el tamaño molecular, el flujo sanguíneo tisular, así como el linfático (Apple y Collinson, 2012 citado por Scirica y Morrow, 2016).

Una enzima clásicamente utilizada para el diagnóstico de la lesión miocárdica es la isoenzima MB de la creatín-quinasa (CPK-MB). Si bien puede ser útil para el diagnóstico del reinfarto (Sanchís *et al.*, 2007-B), su elevación es relativamente poco temprana (entre las 4 y las 6 horas tras el inicio del infarto) y el máximo nivel se alcanza a las 24 horas. Es menos sensible y específica que el marcador utilizado en la presente tesis, la troponina.

La proteína que se detecta más precozmente en sangre periférica una vez iniciado el proceso necrótico, es la mioglobina (comienzo entre las 2 y 4 horas de inicio de la sintomatología). No obstante, la presencia de esta proteína muscular es de poca especificidad ya que se encuentra también en el músculo esquelético y hasta incluso alteraciones poco importantes como el simple esfuerzo físico pueden originar su elevación (Sanchís *et al.*, 2007-B).

Como es sabido, la troponina cardíaca está compuesta por tres subunidades que participan en la contracción muscular. De las tres subunidades la llamada troponina T, además de formar parte del complejo troponina, un pequeño porcentaje de esta, (algo menor de un 10%), se halla disuelta en el citosol. La cantidad de troponina I que se halla en el citado compartimento celular es menor. Actualmente para diagnosticar el infarto de miocardio se recurre a la detección de los niveles plasmáticos de troponina T y/o troponina I. En la presente tesis se ha utilizado la determinación de la subunidad troponina T en una fase precoz.

Las investigaciones desarrolladas dentro del campo de la llamada protección miocárdica, cuyo objetivo consiste en investigar las maniobras farmacológicas encaminadas a reducir el tamaño del infarto, requieren el

4. Discusión

uso, sobre todo a nivel experimental, de diversos procedimientos e indicadores que permiten la delimitación del tamaño del infarto. Su utilización constituyó una alternativa a la determinación de la magnitud de la lesión isquémica mediante el análisis del electrocardiograma epicárdico (elevación del segmento ST, aparición de ondas Q de necrosis transmural). Entre los fármacos usados para evaluar el tamaño del infarto se encuentran la tetraciclina, la cual se fija en la zona isquémica y puede emitir fluorescencia (Lucchesi *et al.*, 1976).

El trifeniltetrazolio, como sal de tetrazolio que es, pertenece a un grupo de aceptores de electrones que cuando se reducen se colorean, ya que se transforman en los llamados formazanos, sustancias muy poco solubles y que por tanto precipitan con facilidad. Dada su capacidad para precipitar, los formazanos son de gran utilidad para localizar zonas tisulares muertas en las que, por tanto, no se producen procesos como los relacionados con la cadena respiratoria u oxidativa mitocondrial. Así pues, la ausencia de procesos de oxidación y transporte electrónico impide que las sales de tetrazolio sufran ningún proceso de reducción y por tanto las zonas afectadas no cambian de color.

Nachlas y Shnitka (1963) introdujeron el uso del azul de tetrazolio, que originaba un producto de reacción que se depositaba en la región del músculo cardíaco sano dándole un color azul oscuro y proporcionando un alto contraste de color entre el tejido necrosado y el sano.

Las sales de tetrazolio se han utilizado por un gran número de autores para identificar y cuantificar el infarto de miocardio, tanto el azul de tetrazolio (Pierce *et al.*, 1973; Alberola *et al.*, 1991) como el trifeniltetrazolio (Fishbein *et al.*, 1981; Such *et al.*, 1993). En el presente trabajo se ha utilizado el trifeniltetrazolio, que origina una coloración rojo ladrillo en el tejido sano.

4.1.7. Sobre la cuantificación del tamaño del infarto

La extensión y el tamaño del área infartada es una de las variables más robustas para la evaluación del daño miocárdico causado por la isquemia y reperfusión, así como de los cambios que se producen tras la administración de un tratamiento o un determinado mecanismo de protección. La importancia de esta determinación reside en que, en función de la cantidad de daño miocárdico irreversible, el remodelado del ventrículo izquierdo, así como la recuperación de la función contráctil y el pronóstico se verán afectados (Bøtker *et al.*, 2018). Los métodos de tinción empleados en el presente trabajo permitieron, una vez finalizado el protocolo electrofisiológico experimental, determinar directamente esta variable.

La extensión del área infartada depende en gran medida de la duración de la isquemia, del área de riesgo, de la existencia y la magnitud de la circulación colateral y de las características de la reperfusión cuando ésta se lleva a cabo (Bøtker *et al.*, 2018). El área de riesgo se define como aquella que está potencialmente destinada a sufrir un proceso necrótico dado que es irrigada por la arteria coronaria ocluida. Se trata de una zona de tejido miocárdico que va a incluir tanto tejido cardiaco dañado como no dañado. El hecho de que en el área de riesgo exista una porción de tejido recuperable depende, entre otros factores, del flujo colateral y del daño causado por la reperfusión (Feng *et al.*, 2014).

Es decir, las características de la circulación coronaria, y en especial, la existencia y magnitud de la circulación colateral, determinan la extensión del daño miocárdico tras la oclusión de una de las arterias coronarias (Hearse, 2000; Teunisse *et al.*, 2012). Es importante relacionar el tamaño del infarto con su correspondiente área de riesgo puesto que, dependiendo de la especie animal, existen importantes variaciones en la circulación colateral. Esta es muy abundante en cobayas, moderada en

4. Discusión

perros y muy escasa en conejos y cerdos (Maxwell *et al.*, 1987; Allahwala *et al.*, 2019). Además, puede haber una variación interindividual importante en algunos animales; de hecho, en modelos caninos se ha demostrado que a pesar de ubicar la oclusión coronaria en el mismo vaso y en la misma posición anatómica, el tamaño del infarto presenta una gran variabilidad, relacionada con las diferencias en los patrones de distribución de las arterias coronarias y la circulación colateral (Cops *et al.*, 2019). Cabe destacar que en conejos la circulación colateral es escasa y la anatomía coronaria es bastante constante, por lo que existe menos variabilidad en el tamaño del infarto, siendo por tanto los resultados más reproducibles.

En el presente trabajo se ha analizado la relación existente entre el tamaño del infarto y el área de riesgo. Por tanto, al referir el tamaño del infarto a la región perfundida por la arteria se normaliza la cuantificación de este parámetro. La determinación del área de riesgo puede realizarse mediante la inyección en el ventrículo izquierdo de un colorante (por ejemplo, de azul de metileno o tioflavina), inmediatamente antes de extraer el corazón del animal, o mediante la perfusión del colorante por la aorta de modo retrógrado, en el corazón aislado, como se ha realizado en la presente tesis.

Además de analizar el tamaño del infarto respecto al área de riesgo, en el presente trabajo también se ha relacionado la extensión de la zona infartada con respecto al ventrículo izquierdo, lo que ha permitido obtener información sobre el porcentaje de miocardio necrosado respecto al resto de tejido miocárdico. Esta cuantificación se ha realizado en las secciones del ventrículo izquierdo obtenidas a partir de la zona de oclusión de la arteria coronaria y por tanto no se refieren a la totalidad del ventrículo.

4.2. Consideraciones relativas a los resultados obtenidos

4.2.1. Respecto a la extensión del daño miocárdico, la función cardiaca y las características del área dañada

Tal como se ha comentado anteriormente la extensión de la zona infartada es una de las variables más robustas para la evaluación del daño miocárdico. La función ventricular y la liberación de biomarcadores son criterios que también se emplean para la valoración de la cardioprotección (Bøtker *et al.*, 2018). Los procedimientos utilizados en el presente trabajo y los métodos de tinción complementarios han permitido determinar directamente el tamaño del infarto una vez finalizado el protocolo experimental. Previamente, durante el seguimiento, la monitorización de la función ventricular mediante técnicas de imagen ha aportado información útil, al igual que el análisis de marcadores de daño miocárdico en el periodo inmediato posterior a los procedimientos de isquemia y reperfusión. En la práctica clínica, estos métodos son utilizados para establecer el diagnóstico de infarto de miocardio y sus repercusiones (Weil *et al.*, 2017; Lindsey *et al.*, 2018).

En el grupo control se observó un incremento de los niveles de troponina T tanto a los cinco minutos como a la hora del inicio de la reperfusión, indicadores de que, debido al periodo de isquemia, tanto los mecanismos de muerte celular como la apoptosis, se han iniciado en el corazón (Mair *et al.*, 2018) provocando un daño irreversible en el tejido cardiaco con pérdida de la integridad del sarcolema y liberación de proteínas como las troponinas (Archan y Fleisher, 2010). En el grupo tratado con ácido valproico también se observó un incremento de los niveles de TnT a los cinco minutos y a la hora del inicio de la reperfusión. Sin embargo, este incremento fue menor que el del grupo control. Los menores niveles de troponina en el grupo tratado se interpretan como un efecto claramente beneficioso ya que indican que el efecto deletéreo debido a la

4. Discusión

oclusión coronaria se ha prevenido parcialmente por el fármaco objeto de estudio. No obstante, las razones por las que el ácido valproico ha exhibido este efecto beneficioso no han sido estudiadas en el presente trabajo.

El valor máximo de troponina sería más informativo que las determinaciones realizadas en la fase inicial de la lesión por isquemia y reperusión. Sin embargo, la monitorización temprana de la troponina cardíaca sérica ha sido útil para demostrar la existencia de daño miocárdico en los grupos control y tratado con ácido valproico. En el grupo falso operado se observó un ligero incremento de este marcador que puede estar relacionado con las manipulaciones quirúrgicas. Estas implican cierto grado de lesión miocárdica como la que puede producir la propia transfixión con aguja realizada en el tejido miocárdico al reproducir todas las maniobras efectuadas en los grupos control y tratado, exceptuando la oclusión coronaria.

El tamaño del infarto es un indicador de daño miocárdico irreversible. En el grupo falso operado en el que se realizó la transfixión de la arteria coronaria circunfleja sin anudar la sutura, no se observó área infartada en el área irrigada por dicha arteria. La determinación del área de riesgo tras la realización del estudio electrofisiológico ha permitido analizar su extensión independientemente de si la arteria había sido ocluida temporalmente (grupos control y tratado con ácido valproico) o no (grupo falso operado). Las áreas de riesgo de los tres grupos experimentales no mostraron diferencias estadísticamente significativas, con lo que se puede confirmar la reproducibilidad del procedimiento de oclusión coronaria.

La extensión del tamaño del infarto en el grupo tratado con ácido valproico (cuantificada tanto con respecto al ventrículo izquierdo como al área de riesgo) fue menor que la del grupo control. Tian *et al.*, (2019) en un modelo de ratas con infarto inducido mediante oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda y tratadas con ácido valproico,

observaron que el ácido valproico ejerce un papel cardioprotector caracterizado por una reducción significativa del tamaño del infarto, de la muerte celular, de los marcadores presentes en la circulación y del remodelado cardiaco con una función cardiaca mejorada. También incrementó la expresión de Foxm1, un regulador clave de la expresión génica para la protección y reparación del corazón. Así pues, el ácido valproico ha mostrado efectos beneficiosos en cuanto a la prevención de la extensión del tamaño del infarto y del remodelado ventricular adverso.

Como se ha comentado el remodelado ventricular tiene lugar tras una lesión cardiaca como el infarto de miocardio y se caracteriza por la alteración de la arquitectura ventricular, con un incremento del volumen y alteración de la configuración de la cámara. Este remodelado está relacionado con disfunción y arritmias cardiacas (Burns *et al.*, 2002; Parviz *et al.*, 2017; Frangogiannis, 2019). Esto es impulsado a nivel histológico por una combinación de hipertrofia patológica, apoptosis de los cardiomiocitos, proliferación de miofibroblastos y fibrosis intersticial (Konstam *et al.*, 2011). La fracción de eyección del ventrículo izquierdo es una de las variables más comunes que se utilizan en clínica para analizar la función cardiaca, y se ve influenciada por el grado de remodelado del ventrículo izquierdo. Por otra parte, la dimensión telediastólica del ventrículo izquierdo también se utiliza como indicador del remodelado ventricular (Konstam *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2020). Tras el infarto de miocardio en una fase inicial se produce la expansión del área infartada, mientras que una fase más tardía se puede producir dilatación dependiente del tiempo, distorsión de la forma ventricular e hipertrofia mural (Guo *et al.*, 2020). Con el objetivo de estudiar el remodelado ventricular tras el infarto, en el presente trabajo también se analizaron diversos parámetros ecocardiográficos en la segunda y quinta semana tras la inducción del infarto.

4. Discusión

En la quinta semana tras el infarto, en el grupo control tanto el diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo como el telesistólico fueron mayores que en el grupo falso operado, mientras que no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y los otros grupos experimentales.

En cuanto a la fracción de eyección, en el grupo control fue menor que en el grupo falso operado, tanto en la segunda como en la quinta semana. Asimismo, en la quinta semana la fracción de eyección del grupo tratado con ácido valproico fue menor que en el grupo falso operado. Este parámetro, en el grupo tratado, mostró una tendencia a ser mayor que en el grupo control, sin alcanzar significación estadística. Estos datos sugieren que la administración de ácido valproico puede tener efectos beneficiosos sobre el remodelado adverso. En un estudio realizado por Tian *et al.*, (2019) observaron, entre otros resultados que ya han sido comentados, que el tratamiento con ácido valproico en las 12 horas posteriores al infarto de miocardio mejoraba la función cardíaca. Además, estudiaron los efectos de la administración continua de ácido valproico durante 28 días y observaron que previno la progresión del infarto y el deterioro de la función cardíaca. En esta línea, Lee *et al.*, (2007) también estudiaron el efecto del ácido valproico, entre otros inhibidores de las desacetilasas de histonas, sobre el remodelado ventricular tras el infarto. Observaron que el ácido valproico redujo la hipertrofia de los cardiomiocitos, la formación de colágeno en las zonas lejana y limítrofe al infarto e incrementó la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo. Es decir, los inhibidores de las HDAC han mejorado algunas de las manifestaciones del remodelado del ventrículo izquierdo. La atenuación del remodelado puede ayudar a prevenir la transición que se produce desde la dilatación compensatoria hacia la disfunción ventricular y la insuficiencia cardíaca.

4.2.2. Respecto a los resultados del estudio electrofisiológico

Los procesos implicados en el daño miocárdico por isquemia/reperfusión contribuyen al desarrollo de disfunción ventricular, con la aparición subsiguiente de insuficiencia cardíaca y de arritmias ventriculares (Di Diego y Antzelevitch, 2011; Myerburg y Junttila, 2012; Rajtik *et al.*, 2016; Baumeister y Quinn, 2016; Glinge *et al.*, 2016), que son responsables de gran parte de los episodios de muerte súbita cardíaca en estos pacientes.

La vulnerabilidad arrítmica, tanto en la cardiopatía isquémica como en el contexto de la insuficiencia cardíaca, está influida por múltiples factores. Entre ellos se encuentran las propiedades electrofisiológicas (excitabilidad, refractariedad, conducción, longitud de onda), su grado de dispersión y de heterogeneidad (anisotropía, alternancia eléctrica, bloqueos), así como alteraciones estructurales del tejido, como el grado de fibrosis, dilatación y estiramiento de las fibras miocárdicas (Schotten *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2012; Rajtik *et al.*, 2016). En los procesos fibrilatorios intervienen, entre otros, mecanismos de autoperpetuación basados en la reactivación continua del miocardio. Moe (Moe y Abildskov, 1959; Moe, 1962) propuso que la arritmia se mantenía debido a la heterogeneidad (espacial y temporal) de las propiedades electrofisiológicas. Esta heterogeneidad hacía posible la formación de múltiples ondas simultáneas de activación que reactivaban zonas previamente despolarizadas una vez recuperada la excitabilidad.

La presencia de fibrosis en el tejido miocárdico altera los patrones de transmisión de la activación, genera anisotropía y heterogeneidad en la conducción y favorece las activaciones reentrantes (Gaudesius *et al.*, 2003; de Jong *et al.*, 2011; Begg *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2017; Núñez *et al.*, 2018). La fibrosis, el aumento del contenido de colágeno de la matriz extracelular

4. Discusión

y del número de miofibroblastos modifican la excitabilidad, enlentecen la velocidad de conducción, aumentan las zonas de bloqueo y la heterogeneidad en la transmisión de la activación miocárdica. Así pues, la destrucción de tejido miocárdico, su sustitución por tejido fibroso y los cambios anatómicos y funcionales que constituyen el denominado remodelado, forman parte de los procesos patológicos implicados en los síndromes coronarios. El remodelado incluye modificaciones macroscópicas en la morfología cardíaca que se acompañan de diversos cambios adaptativos a nivel tisular, celular y subcelular, en respuesta a estímulos biomecánicos y bioquímicos. Los cambios incluyen el aumento del volumen ventricular, la transición a formas ventriculares globulares o esféricas y la disminución de la fracción de eyección. Como consecuencia se altera la función de bomba y aumenta el riesgo de secuelas desfavorables como la disfunción valvular, la insuficiencia cardíaca y el desencadenamiento de arritmias (Pu y Boyden, 1997; Spach y Boineau, 1997; Danik *et al.*, 2004; Miragoli *et al.*, 2006; Rohr, 2009).

Los inhibidores de las HDAC enlentecen el proceso de remodelado cardíaco, disminuyen la fibrosis intersticial y mejoran la función cardíaca, tanto en el contexto del infarto agudo de miocardio como en el de otros procesos que promueven el desarrollo de disfunción ventricular (Xie y Hill, 2013; Nural-Guvener *et al.*, 2014; Bagchi y Weeks, 2019; Lyu *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019). Así, en modelos murinos de infarto por oclusión coronaria el ácido valproico y la tributirina disminuyen la hipertrofia de los miocitos y la cantidad de colágeno tras el infarto (Lee *et al.*, 2007). También en modelos murinos de oclusión coronaria permanente se han demostrado los efectos beneficiosos de la tricostatina A (TSA) tanto para reducir el tamaño del infarto como para atenuar el proceso de remodelado postinfarto (Zhang *et al.*, 2012). En modelos de isquemia y reperfusión TSA o scriptaid (inhibidor global de las HDAC) reducen el tamaño del infarto y preservan

la función cardíaca incluso cuando son administrados tras la reperfusión (Zhao *et al.*, 2007; Granger *et al.*, 2008). En modelos de isquemia/reperfusión con animales de mayor tamaño el inhibidor de HDAC vorinostat también ha mostrado efectos cardioprotectores tanto al ser administrado antes de la oclusión coronaria como durante el proceso de reperfusión (Xie *et al.*, 2011).

Aunque se dispone de información sobre los efectos estructurales y funcionales de los inhibidores de las HDAC en el contexto de la sobrecarga ventricular y del infarto de miocardio, en la literatura existe poca información sobre los efectos electrofisiológicos de los inhibidores de las HDAC tanto basalmente como en el contexto del infarto. En el presente estudio se han analizado los efectos de la inhibición de las HDAC con ácido valproico sobre la electrofisiología cardíaca y la inducibilidad de arritmias.

Los resultados obtenidos muestran que no hubo diferencias significativas en los promedios de los periodos refractarios ventriculares efectivo y funcional según los grupos. Tampoco hubo diferencias entre los grupos en los intervalos VV, aunque sí que se observaron diferencias entre las zonas limítrofe y lejana en el grupo control, pero no en el grupo tratado, y lo mismo sucedió con el P5, indicador de refractariedad durante la FV. Estos datos son coherentes con los resultados relativos a la heterogeneidad electrofisiológica, evaluada en el presente trabajo mediante el análisis del coeficiente de variación de los intervalos VV, que muestran diferencias significativas entre las zonas limítrofe y lejana en el grupo control, pero no en el tratado, en el que además este parámetro es significativamente menor que en el grupo control.

Por otra parte, en el grupo tratado se ha observado que el coeficiente de variación de los periodos refractarios tanto efectivo como funcional ha sido menor que en los otros dos grupos, al igual que el coeficiente de

4. Discusión

variación de los intervalos VV en la zona limítrofe, que ha sido menor que en el grupo control. Así mismo la concentración espectral obtenida en la zona limítrofe del grupo tratado ha sido significativamente mayor que en los otros dos grupos, indicadora de una activación más regular.

En relación con la inducibilidad de la FV, el ácido valproico la ha disminuido globalmente. Además, al analizar la mayor o menor dificultad para inducir la arritmia, su desencadenamiento ha sido más difícil en presencia del fármaco, ya que el número de extraestímulos necesarios para conseguirlo ha sido mayor en el grupo tratado con ácido valproico que en los grupos control y falso operado. También se ha observado que, independientemente del grupo analizado, los casos en los que se ha inducido la FV presentan menores periodos refractarios mínimos, resultado que también se ha obtenido al analizar aisladamente el grupo tratado.

Al considerar las variables relacionadas con la heterogeneidad electrofisiológica, el coeficiente de variación de los periodos refractarios ha sido significativamente mayor en los casos en los que se ha conseguido inducir la FV, independientemente del grupo analizado. Los resultados obtenidos en cada grupo muestran que también han existido diferencias significativas en los grupos falso operado y control, mientras que no han alcanzado significación estadística en el grupo tratado. Es decir, el coeficiente de variación de los periodos refractarios ha influido en la inducibilidad de la FV tanto en el grupo control como en el falso operado, pero no en el tratado.

Las correlaciones entre inducibilidad de la FV y los periodos refractarios mínimos han sido inversas (menores periodos refractarios mínimos aumentan la probabilidad de inducir la FV), mientras que las obtenidas al considerar los parámetros de heterogeneidad (coeficiente de variación del periodo refractario efectivo y funcional) han sido directas (a

mayor heterogeneidad mayor probabilidad de inducir la FV). Finalmente, el análisis multivariado ha identificado como variable independiente al indicador de heterogeneidad coeficiente de variación del periodo refractario efectivo.

Así pues, la disminución de la inducibilidad de la FV ha ocurrido sin cambios en la refractariedad basal producidos por el ácido valproico, pero con modificaciones significativas en la heterogeneidad electrofisiológica, que podrían ser secundarias a la modificación del proceso de cicatrización tras el infarto, inducida por el ácido valproico.

4.3. Limitaciones del estudio

En el presente trabajo se ha utilizado un modelo experimental de infarto de miocardio por isquemia y reperfusión empleando como animal de experimentación el conejo. Los modelos animales experimentales permiten avanzar en el conocimiento de las enfermedades, y obtener nuevos enfoques terapéuticos, preventivos y diagnósticos. Previamente se han comentado las características diferenciales de distintos modelos en función de la especie animal empleada. El modelo utilizado es apropiado para el estudio de los procesos asociados con el daño miocárdico producido por el infarto y ha permitido obtener información relacionada con los efectos de la inhibición de las HDAC sobre las modificaciones de las propiedades electrofisiológicas y la inducibilidad de arritmias asociadas al daño miocárdico.

La utilización de preparaciones de corazón aislado y perfundido evita las interferencias de factores extrínsecos sobre las variables y parámetros electrofisiológicos estudiados y facilita el análisis de los fenómenos mediante la utilización de sistemas cartográficos de alta resolución, aunque la extrapolación de los resultados al ser humano debe

4. Discusión

efectuarse teniendo en cuenta las diferencias interespecies así como las influencias de los factores extrínsecos tanto nerviosos centrales como humorales. Por otra parte, y en relación con lo que ya se ha comentado previamente, no se han tenido en cuenta los efectos de la carga contra la que ha de trabajar el corazón, ya que el modelo presenta únicamente la ligera precarga para el ventrículo derecho que supone el flujo coronario de retorno.

No obstante, los resultados obtenidos en la presente tesis aportan información útil para plantear la pertinencia de estudios clínicos encaminados al control de los efectos arritmogénicos de la cardiopatía isquémica.

En relación con la administración del fármaco en estudio, es importante destacar que habitualmente y con carácter terapéutico los fármacos utilizados en la protección cardiovascular se administran una vez presentado un determinado cuadro clínico. No obstante, en el presente trabajo, siguiendo una metodología comúnmente utilizada para la realización de estudios similares se ha administrado previamente a la inducción, en este caso, de la isquemia, lo cual debe ser tenido en cuenta al analizar la aplicabilidad de los resultados obtenidos.

En relación con el fármaco objeto de estudio que corresponde a un inhibidor poco específico, el desarrollo de estudios con inhibidores de las HDAC más específicos puede aportar información adicional.

Por otro lado, en relación con el sistema de registro empleado, la configuración de la placa multielectrodo, dificulta el acople corazón-multielectrodo por lo que en algunos de los casos estudiados puede que no sea total u óptima. Como se ha comentado con anterioridad esto podría aumentar el nivel de error en los registros debido al incremento de ruido o a interferencias. Hay que tener en cuenta que en el análisis de las

características de la señal fibrilatoria en el dominio del tiempo, si la señal está interferida o es de mala calidad, la ubicación de las marcas puede presentar especial dificultad. También el análisis de la fibrilación en el dominio de la frecuencia está sujeto a influencias dependientes de diversos factores, como son la interferencia debida a los potenciales o campos lejanos, el “ruido” o la duración del registro, que subrayan la necesidad de una cuidadosa evaluación de las señales y la utilización de técnicas de procesamiento robustas.

Otra limitación es la utilización de registros obtenidos desde el epicardio, hecho que dificulta el análisis más exhaustivo de lo que sucede en el resto del miocardio. La fibrilación ventricular es un fenómeno complejo que ocurre en un medio tridimensional y los sistemas de cartografía utilizados aportan información directa de los procesos de activación en las zonas más cercanas a la superficie epicárdica ventricular.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

En la presente tesis doctoral se ha investigado, en un modelo de infarto crónico (seis semanas) en conejo, el efecto de la administración de un inhibidor de las desacetilasas de histonas, el ácido valproico, sobre la magnitud del miocardio infartado y sobre determinadas propiedades electrofisiológicas y mecánicas del miocardio ventricular, habiéndose obtenido las siguientes conclusiones:

1. El modelo de infarto crónico que se ha desarrollado, validado mediante indicadores bioquímicos en suero e identificación por métodos de tinción macroscópica, ha posibilitado la realización del presente estudio y puede ser de interés para la realización de investigaciones de características similares.
2. El ácido valproico ha exhibido un efecto protector manifestado por su capacidad para reducir la magnitud del daño miocárdico.
3. El ácido valproico ha mostrado capacidad para prevenir el desencadenamiento de la fibrilación ventricular.
4. La protección antiarrítmica exhibida por el ácido valproico puede relacionarse con su capacidad para reducir la heterogeneidad electrofisiológica, evidenciada en el presente trabajo.
5. El efecto beneficioso del ácido valproico se ha manifestado asimismo sobre el remodelado ventricular.

Como conclusión global podemos afirmar sobre la base de los resultados obtenidos en el modelo experimental puesto a punto, que el ácido valproico ha exhibido un efecto protector sobre el miocardio isquémico. Dicho efecto protector podría estar ligado a la prevención de la fibrosis derivada de su capacidad para inhibir las desacetilasas de histonas.

Capítulo 6

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

Aaronson P.I., Ward J.P.T, Wiener C.M., Schulman S.P., Gill J.S. (2001) “Fisiopatología del infarto agudo de miocardio”. En Aaronson P.I., Ward J.P.T, Wiener C.M., Schulman S.P., Gill J.S. *El sistema cardiovascular en esquemas*. 1ª edición. España: Ars Médica, pp.84-85.

Alberola A., Such L., Gil F., Zaragoza R., Morcillo E.J. (1991) “Protective effect of N-acetylcysteine on ischaemia-induced myocardial damage in canine heart”. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 343(5), pp. 505-10.

Alberola, A., Revert, F., Moya, A., Beltrán, J., García, J., San Martín, E., Sancho, S., Such, L. (2000) “Intravenous BQ-123 and phosphoramidon reduce ventricular ectopic beats and myocardial infarct size in dogs submitted to coronary occlusion and reperfusion”. *General Pharmacology: The Vascular System*, 35, pp. 143-147.

Alcalá López J.E., Bellido CM., Hernández Simón P. y Rodríguez Padial L. (2017) “Cardiopatía isquémica: concepto, clasificación, epidemiología, factores de riesgo, pronóstico y prevención”. *Medicine*, 12(36), pp.2145-52.

Algranati D., Ghassan S., Kassab G.S., and Lanir Y. (2011) “Why is the subendocardium more vulnerable to ischemia? A new paradigm”. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300, pp. H1090–H1100.

Allahwala, U.K.; Weaver, J.; Bhindi, R. (2019) “Animal chronic total occlusion models: A review of the current literature and future goals”. *Thromb. Res*, 177, pp. 83–90.

Allesie MA, Bonke FJ, Schopman FJ. (1976) “Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The “leading circle” concept. A new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle”. *Cir Res*, 39, pp. 168–77.

Alpert J.S. (1989) “The pathophysiology of acute myocardial infarction”. *Cardiology*, 76(2), pp. 85-95.

Angiolilli, C.; Kabala, P.A.; Grabiec, A.M.; Van Baarsen, I.M.; Ferguson, B.S.; Garcia, S.; Malvar Fernandez, B.; McKinsey, T.A.; Tak, P.P.; Fossati, G.; et al. (2017) “Histone deacetylase 3 regulates the inflammatory gene expression programme of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes”. *Ann. Rheum. Dis*, 76, pp. 277–285.

Apple FS, Collinson PO. (2012) “Analytical characteristics of high sensitivity cardiac troponin assays”. *Clin Chem*, 58, 54.

6. Referencias bibliográficas

Archan, S.; Fleisher, L.A. (2010) “From Creatine Kinase-MB to Troponin”. *Anesthesiology*, 112, pp.1005–1012.

Arias-Mutis, O.J.; Marrachelli, V.G.; Ruiz-Sauri, A.; Alberola, A.; Morales, J.M.; Such-Miquel, L.; Monleón, D.; Chorro, F.J.; Such, L.; Zarzoso, M. (2017) “Development and characterization of an experimental model of diet-induced metabolic syndrome in rabbit”. *PLoS ONE*, 12, e0178315.

Bagchi R.A., Weeks K.L. (2019) “Histone deacetylases in cardiovascular and metabolic diseases”. *J Mol Cell Cardiol*, 130, pp. 151-159.

Barzyc A., Lysik W., Slyk J., Kuszewski M., Zarębiński M., Wojciechowska M., Cudnoch-Jędrzejewska A. (2020) “Reperfusion injury as a target for diminishing infarct size”. *Med Hypotheses*, 137, 109558.

Baum J. and Duffy H.S. (2011) “Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about?”. *J Cardiovasc Pharmacol*, 57(4), pp. 376–379.

Baumeister P., Quinn TA. (2016) “Altered Calcium Handling and Ventricular Arrhythmias in Acute Ischemia”. *Clin Med Insights Cardiol*, 14, 10(Suppl 1), pp. 61-69.

Bayés de Luna A., Elosua R. (2012) “Muerte súbita”. *Rev Esp Cardiol*, 65(11), pp.1039–1052.

Begg GA, Holden AV, Lip GY, Plein S, Tayebjee MH. (2016) “Assessment of atrial fibrosis for the rhythm control of atrial fibrillation”. *Int J Cardiol*, 220, pp. 155-61.

Berry J.M., Cao D.J., Rothermel B.A. and Hill J.A. (2008) “Histone deacetylase inhibition in the treatment of heart disease”. *Expert Opinion on Drug Safety*, 7(1), pp. 53-67.

Bialik S., Geenen D.L., Sasson I.E. (1997) “Myocyte Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in the Mouse Localizes to Hypoxic Regions but Occurs Independently of p53”. *J Clin Invest*, 100(6), pp. 1363–1372.

Billman GE. (2008) “The cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel as a novel target for anti-arrhythmic therapy”. *Pharmacology & Therapeutics*, 120, pp.54-70.

Bodí, V.; Sanchis, J.; Mainar, L.; Chorro, F.J.; Nunez, J.; Monmeneu, J.V.; Chaustre, F.; Forteza, M.J.; Ruiz-Sauri, A.; López-Lereu, M.P.; et al. (2010)

“Right ventricular involvement in anterior myocardial infarction: A translational approach”. *Cardiovasc. Res*, 87, pp. 601–608.

Bodi V., Ruiz-Nodar JM., Feliu E., Minana G., Nunez J., Husser O., Martinez-Elvira J., Ruiz A., Bonanad C., Monmeneu JV., Lopez-Lereu MP., Forteza MJ., de Dios E., Hervas A., Moratal D., Gomez C., Mainar L., Sanchis J., Mainar V., Valencia J., Diaz A., Noguera I., Chaustre F., Chorro FJ. (2014) “Effect of ischemic postconditioning on microvascular obstruction in reperfused myocardial infarction. Results of a randomized study in patients and of an experimental model in swine”. *Int J Cardiol*, 175(1), pp. 138-46.

Bonanad C., Ruiz-Sauri A., Forteza MJ., Chaustre F., Minana G., Gomez C., Diaz A., Noguera I., de Dios E., Nunez J., Mainar L., Sanchis J., Morales JM., Monleon D., Chorro FJ., Bodí V. (2013) “Microvascular obstruction in the right ventricle in reperfused anterior myocardial infarction. Macroscopic and pathologic evidence in a swine model”. *Thromb Res*, 132 (5), pp. 592-8.

Bopassa J.C. (2012) “Protection of the ischemic myocardium during the reperfusion: between hope and reality”. *Am J Cardiovasc Dis*, (3), pp.223-236.

Bøtker, H.E.; Hausenloy, D.; Andreadou, I.; Antonucci, S.; Boengler, K.; Davidson, S.M.; Deshwal, S.; Devaux, Y.; Di Lisa, F.; Di Sante, M.; et al. (2018) “Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection”. *Basic Res. Cardiol*, 113, 39.

Boyle MP, Weisman HF. (1993) “Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model”. *Circulation*, 88, pp. 2872-83.

Buja M.L. (2005) “Myocardial ischemia and reperfusion injury”. *Cardiovascular Pathology*, 14, pp. 170– 175.

Buja M.L., (2013) “The Pathobiology of Acute Coronary Syndromes Clinical Implications and Central Role of the Mitochondria”. *Tex Heart Inst J*, 40(3), pp.221-8.

Burns R.J., Gibbons R.J., Yi Q., Roberts R.S., Miller T.D., Schaer G.L., Anderson J.L., Yusuf S., CORE Study Investigators (2002) “The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis”. *J Am Coll Cardiol*, 39 (1), pp.30-6.

6. Referencias bibliográficas

Calvo CJ., Lozano WM., Arias-Mutis OJ., Such-Miquel L., Such L., Genovés P., Guill A., Millet J., Chorro FJ., Alberola A., Pandit SV., Zarzoso M. (2019) “Modifications of short-term intrinsic pacemaker variability in diet-induced metabolic syndrome: a study on isolated rabbit heart”. *J Physiol Biochem*,75(2), pp. 173-183.

Canty, J.M., y Duncker D.J. (2016) “FLujo sanguíneo coronario e isquemia miocárdica”. En Mann D.L., Zipes D.P., Libby P., Bonow R.O. and Braunwald E. *Braunwald tratado de cardiología. Texto de medicina cardiovascular*. 10ª edición. España: Elsevier S.L.U. pp.1029-1056.

Cardinal R, Vermeulen M, Shenasa M, Roberge F, Page P, Hélie F and Savard P. (1988) “Anisotropic conduction and functional dissociation of ischemic tissue during reentrant ventricular tachycardia in canine myocardial infarction”. *Circulation*, 77, pp. 1162-1176.

Cardinale JP., Sriramula S., Pariaut R., Guggilam A., Mariappan N Elks CM., Francis J. (2010) “HDAC inhibition attenuates inflammatory, hypertrophic, and hypertensive responses in spontaneously hypertensive rats”. *Hypertension*, 56, pp. 437–44.

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

Cascio W.E. (2001) “Myocardial ischemia: what factors determine arrhythmogenesis?”. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 12(6), pp.726-729.

Chorro, F.J.; Such-Belenguer, L.; López-Merino, V. (2009) “Animal Models of Cardiovascular Disease”. *Rev. Esp. Cardiol*, 62, pp. 69–84.

Chorro FJ, Millet J, Ferrero A, Cebrián A, Cánoves J, Martínez A, Mainar L, Porres JC, Sanchis J, López Merino V, Such L. (2002) “Effects of myocardial stretching on excitation frequencies determined by spectral analysis during ventricular fibrillation”. *Rev Esp Cardiol*, 55, pp. 1143-50.

Chorro FJ, Cánoves J, Mainar L, Sanchis J, Such L, and López Merino V. (2000) “Alteration of ventricular fibrillation by flecainide, verapamil and sotalol. An experimental study”. *Circulation*, 101, pp. 1606-1615.

Cochain C., Channon KM., Silvestre JS. (2013) “Angiogenesis in the infarcted myocardium”. *Antioxid Redox Signal*, 18, pp. 1100-13.

Cops, J.; Haesen, S.; De Moor, B.; Mullens, W.; Hansen, D. (2019) “Current animal models for the study of congestion in heart failure: An overview”. *Heart Fail. Rev*, 24, pp. 387–397.

Coronel, R., Wilms-Schopman, F. J., Opthof, T., van Capelle, F. J., & Janse, M. J. (1991). “Injury current and gradients of diastolic stimulation threshold, TQ potential, and extracellular potassium concentration during acute regional ischemia in the isolated perfused pig heart”. *Circ Res*, 68, pp. 1241–1249.

Coronel, R., Wilms-Schopman, F. J., Dekker, L. R., & Janse, M. J. (1995). “Heterogeneities in $[K^+]_o$ and TQ potential and the inducibility of ventricular fibrillation during acute regional ischemia in the isolated perfused porcine heart”. *Circulation*, 92, pp. 120–129.

Danik SB., 1, Liu F, Zhang J, Suk HJ, Morley GE, Fishman GI, Gutstein DE. (2004) “Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility”. *Circ Res*, 12, 95(10), pp. 1035-41.

Daskalopoulos E.P., Janssen B.J.A., and Blankesteyjn W.M. (2012) “Myofibroblasts in the Infarct Area: Concepts and Challenges”. *Microsc. Microanal*, 18, pp. 35-49.

Dégano IR., Elosua R. y Marrugat Jaume. (2013) “Epidemiología del síndrome coronario agudo en España: estimación del número de casos y la tendencia de 2005 a 2049”. *Rev Esp Cardiol*, 66(6), pp. 472–481.

De Jong S., Van Veen T.A.B., Van Rijen H.V.M., and De Bakker J.M.T. (2011) “Fibrosis and Cardiac Arrhythmias”. *J Cardiovasc Pharmacol*, 57(6), pp. 630-638.

De Bakker JMT, van Rijen HVM. (2007) “Electrocardiographic manifestation of anatomical substrates underlying post–myocardial infarction tachycardias”. *J Electrocardiol*, 40(Suppl1), pp. S21-S25.

del Canto I., Santamaría L., Genovés P., Such-Miquel L., Arias-Mutis O., Zarzoso M., Soler C., Parra G., Tormos A., Alberola A., Such L., Chorro FJ. (2018) “Effects of the Inhibition of Late Sodium Current by GS967 on Stretch-Induced Changes in Cardiac Electrophysiology”. *Cardiovasc Drugs Ther*, 32(5), pp. 413-425.

del Canto Serrano I. (2014) *Estudio de las modificaciones farmacológicas de los efectos electrofisiológicos producidos por el estiramiento local miocárdico a partir de técnicas dinámicas de cartografía eléctrica en un modelo*

6. Referencias bibliográficas

experimental de corazón aislado de conejo. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.

Di Diego JM, Antzelevitch C. (2011) “Ischemic ventricular arrhythmias: experimental models and their clinical relevance”. *Heart Rhythm*, 8(12), pp. 1963-8.

Disertori M., Masè M., and Ravelli F. (2017) “Myocardial fibrosis predicts ventricular tachyarrhythmias”. *Trends Cardiovasc Med*, 27(5), pp. 363-372.

Durrer D, Van Der Tweel LH. (1954) “Spread of activation in the left ventricular wall of the dog. II. Activation conditions at the epicardial surface”. *Am Heart J*, 47, pp. 192-203.

Duytschaever M, Mast F, Killian M, Blaauw Y, Wijffels M, and Allessie M. (2001) “Methods for Determining the Refractory Period and Excitable Gap During Persistent Atrial Fibrillation in the Goat”. *Circulation*, 104, pp. 957–962.

Edwards, A.G.; Louch, W.E. (2017) “Species-Dependent Mechanisms of Cardiac Arrhythmia: A Cellular Focus”. *Clin. Med. Insights Cardiol*, 11, pp. 1–14.

Ellmers LJ, Scott NJ, Piuholo J, et al. (2007) “Npr1- regulated gene pathways contributing to cardiac hypertrophy and fibrosis”. *J Mol Endocrinol*, 38, pp. 245–257.

Feng, Y.; Bogaert, J.; Oyen, R.; Ni, Y. (2014) “An overview on development and application of an experimental platform for quantitative cardiac imaging research in rabbit models of myocardial infarction”. *Quant. Imaging Med. Surg*, 4, pp. 358–375.

Flaherty JT, Weisfeldt ML. (1988) “Reperfusion injury”. *Free Rad Biolo Med*, 5, pp. 409-419.

Francis Stuart SD., De Jesus NM., Lindsey ML., and Ripplinger CM. (2016) “The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction”. *J Mol Cell Cardiol*, 91, pp. 114-22.

Frangogiannis N.G. (2014) “The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling”. *Nat Rev Cardiol*, 11(5), pp. 255-265.

Frangogiannis N.G. (2015) “Pathophysiology of myocardial infarction”. *Compr Physiol*, 5, pp.1841-1875.

Frangogiannis NG. (2019) “Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities”. *Mol Aspects Med*, 65, pp. 70-99.

Fishbein M.C., Meerbaum S., Rit J., Lando U., Kanmatsuse K., Mercier J. C., Corday E., Ganz W. (1981) “Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique”. *Am Heart J*, 101(5), pp. 593-600.

Foreman, K.J., Marquez, N., Dolgert, A., Fukutaki, K., Fullman, N., McGaughey, M., Pletcher, M.A., Smith, A.E., Tang, K., Yuan, C.W., et al. (2018) “Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-Cause and cause-Specific mortality for 250 causes of death: Reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories”. *Lancet*, 392, pp. 2052–2090.

Forteza MJ., Hervas A., de Dios E., Trapero I., Ruiz-Sauri A., Minana G., Bonanad C., Gomez G., Husser O., Núñez J., Chorro FJ., Bodí V. (2014) “Programmed death-1 (PD-1): a novel mechanism for understanding the acute immune deregulation in ST-segment elevation myocardial infarction”. *Int J Cardiol*, 177 (1), pp. 8-10.

Forteza MJ., Trapero I., Hervas A., de Dios E., Ruiz-Sauri A., Minana G., Bonanad C., Gómez C., Oltra R., Ríos-Navarro C., Ketelhuth DFJ., Nunez J., Chorro FJ., Bodi V. (2018) “Apoptosis and Mobilization of Lymphocytes to Cardiac Tissue Is Associated with Myocardial Infarction in a Reperfused Porcine Model and Infarct Size in Post-PCI Patients”. *Oxid Med Cell Longev*, FD1975167.

Fox KA., Bergmann SR., Sobel BE. (1985) “Pathophysiology of myocardial reperfusion”. *Annu Rev Med*, 36, pp. 125-44.

Fujita M, Morimoto Y, Ishihara M, Shimizu M, Takase B, Maehara T, Kikuchi M. (2004) “A new rabbit model of myocardial infarction without endotracheal intubation”. *J Surg Res*, 116(1), pp. 124-8.

Galappaththige S.K.; Pathmanathan P; Bishop M.J. and Gray R.A. (2019) “Effect of Heart Structure on Ventricular Fibrillation in the Rabbit: A Simulation Study”. *Front Physiol*, 10 (564), pp.1-13.

6. Referencias bibliográficas

Gálvez-Montón C., Prat-Vidal C., Díaz-Güemes I., Crisóstomo V., Soler-Botija C., Roura S., Lluçia-Valldeperas A., Perea-Gil I., Sánchez-Margallo F.M., Bayes-Genis A. (2014) “Comparison of two preclinical myocardial infarct models: coronary coil deployment versus surgical ligation”. *J Transl Med*, 12, 137.

García-Dorado D., Rodríguez-Sinovas A., Ruiz-Meana M., Inserte J. (2014) “Protection Against Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Clinical Practice”. *Rev Esp Cardiol*, 67, pp. 394–404.

Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP, Rohr S. (2003) “Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res*, 93, pp. 421-8.

Gaztañaga L., Marchlinski F.E. y Betensky B.P. (2012) “Mecanismos de las arritmias cardiacas”. *Rev Esp Cardiol*, 65(2), pp. 174-185.

Genovés P, Arias-Mutis ÓJ, Parra G, Such-Miquel L, Zarzoso M, Del Canto I, Soler C, Díaz A, Blanch E, Alberola A, Such L, Chorro FJ. (2020) “Development and long-term follow-up of an experimental model of myocardial infarction in rabbits”. *Animals*, 10, pp. 2-19.

Ghodke-Puranik Y, Thorn C.F., Lamba J.K., Leeder J. S., Song W., Birnbaum A.K., Altman R.B., and Klein T.E. (2013) “Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics”. *Pharmacogenet Genomics*, 23(4), pp. 236–241.

Glenisson, W.; Castronovo, V.; Waltregny, D. (2007) “Histone deacetylase 4 is required for TGFbeta1-induced myofibroblastic differentiation”. *Biochim. Biophys. Acta*, 1773, pp.1572–1582.

Glinge C., Sattler S., Jabbari R., Tfelt-Hansen J. (2016) “Epidemiology and genetics of ventricular fibrillation during acute myocardial infarction”. *J Geriatr Cardiol*, 13(9), pp. 789-797.

González A., Schelbert EB., Díez J., Butler J. (2018) “Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives”. *J Am Coll Cardiol*, 71(15), pp. 1696-1706.

Granger A, Abdullah I, et al. (2008) “Histone deacetylase inhibition reduces myocardial ischemia reperfusion injury in mice”. *FASEB J*, 22, pp. 3549-3556.

Grant A., Durrani S. (2007) “Mechanisms of cardiac arrhythmias”. En *Textbook of cardiovascular medicine* 3ª ed. Topol, editor. Filadelfia: Lippincott, pp. 950-63.

Guo, W.; Shan, B.; Klingsberg, R.C.; Qin, X.; Lasky, J.A. (2009) “Abrogation of TGF-beta1-induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition”. *Am. J. Phys. Lung Cell. Mol.Phys*, 297, pp. L864–L870.

Gustafsson AB, Gottlieb RA. (2008) “Eat your heart out: Role of autophagy in myocardial ischemia/reperfusion”. *Autophagy*, 4(4), pp. 416-21.

Guo S, Zhang Y, Zhang Y, Meng F, Li M, Yu Z, Chen Y, Cui G. (2020) “Multiple Intravenous Injections of Valproic Acid-Induced Mesenchymal Stem Cell from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Improved Cardiac Function in an Acute Myocardial Infarction Rat Model”. *Biomed Res Int*, 17, pp. 1-13.

Hacker, T.A. (2018) “Animal Models and Cardiac Extracellular Matrix Research”. In *Cardiac Extracellular Matrix. Advances in Experimental Medicine and Biology*; Schmuck, E., Hematti, P., Raval, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, Volume 1098, pp. 45–58.

Hall, JE. Guyton y Hall. (2016) *Tratado de Fisiología Médica*. 13ª ed. Elsevier. Barcelona.

He N., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, D., Ye, H. (2020) “Exosomes: Cell-Free Therapy for Cardiovascular Diseases”. *J Cardiovasc Transl Res*, 13(5), pp. 713-721.

Hearse, D.J. (2000) “The elusive coypu: The importance of collateral flow and the search for an alternative to the dog”. *Cardiovasc. Res*, 45, pp. 215–219.

Hervas A., de Dios E., Forteza MJ., Miñana G., Nunez J., Ruiz-Sauri A., Bonanad C., Perez-Sole N., Chorro FJ., Bodí V. (2015) “Intracoronary Infusion of Thioflavin-S to Study Microvascular Obstruction in a Model of Myocardial Infarction”. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* ;68(11), pp. 928-34.

Hervas A., Ruiz-Sauri A., de Dios E., Forteza MJ., Minana G., Nunez J., Gomez C., Bonanad C., Perez-Sole N., Gavara J., Chorro FJ., Bodí V. (2016) “Inhomogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: results in a swine model and in human samples”. *J Anat*, 228(1), pp. 47-58.

6. Referencias bibliográficas

Higginson LA., Beanlands DS., Nair RC., Temple V., Sheldrick K. (1983) “The time course and characterization of myocardial hemorrhage after coronary reperfusion in the anesthetized dog”. *Circulation*, 67 (5), pp. 1024-1031.

Hueso L., Ríos-Navarro C., Ruiz-Sauri A., Chorro FJ., Nunez J., Sanz MJ., Bodí V. (2017) “Dynamics and implications of circulating anti-angiogenic VEGF-A 165 b isoform in patients with ST-elevation myocardial infarction”. *Sci Rep*, 7(1), pp. 9962.

Huikuri HV., Junttila MJ. (2020) “Is it possible to predict and prevent sudden cardiac death as a first manifestation of cardiac disease?” *Int J Cardiol*, 303, pp. 60-61.

Hull, E.E.; Montgomery, M.R.; Leyva, K.J. (2016) “HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases”. *Biomed. Res. Int*, 8797206, pp. 1-15.

Humeres C., Frangogiannis N.G. (2019) “Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart”. *JACC Basic Transl Sci.*, 4(3), pp. 449-467.

Hundahl L.A, Tfelt-Hansen J., and Thomas Jespersen T. (2017) “Rat Models of Ventricular Fibrillation Following Acute Myocardial Infarction”. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 22(6), pp. 514-528.

Isorni, M.-A.; Casanova, A.; Piquet, J.; Bellamy, V.; Pignon, C.; Puymirat, E.; Menasché, P. (2015) “Comparative Analysis of Methods to Induce Myocardial Infarction in a Closed-Chest Rabbit Model”. *BioMed Res. Int*, pp. 1–9.

Janse MJ, Opthof T, Kléber AG. (1998) “Animal models of cardiac arrhythmias”. *Cardiovasc Res*, 39, pp. 165-177.

Jazayeri, M.A., Emert, M.P. (2019) “Sudden Cardiac Death: Who Is at Risk?” *Med. Clin. N. Am*, 103, pp. 913–930.

Jennings RB., Sommers HM., Smyth GA., Flack HA., Linn H. (1960) “Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog”. *Arch Pathol*, 70, pp. 68-78.

Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C Jr., Reimer KA. (1985) “Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure”. *Circ Res*, 56, pp. 262-278.

Jeong EM., Liu M., Sturdy M., Gao G., Varghese ST., Sovari AA., Dudley Jr SC. (2012) “Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia”. *J Mol Cell Cardiol*, 52(2), pp. 454-63.

Jin L, Lin MQ, Piao ZH, et al. (2017) “Gallic acid attenuates hypertension, cardiac remodeling, and fibrosis in mice with NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension via regulation of histone deacetylase 1 or histone deacetylase 2”. *J Hypertens*, 35, pp.1502–1512.

Jin, Ch., Wu, J., Watanabe, M., Okada, T., and Iesaki, T. (2012) “Mitochondrial K⁺ channels are involved in ischemic postconditioning in rat hearts”. *The Journal of Physiological Sciences*, 62, pp. 325–332.

Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M. and Korthuis R.J. (2017) “Ischemia/Reperfusion”. *Compr Physiol*, 7(1), pp. 113-170.

Kang SH, Seok YM, Song MJ, Lee HA, Kurz T, Kim I. (2015) “Histone deacetylase inhibition attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis through acetylation of mineralcorticoid receptor in spontaneously hypertensive rats”. *Mol Pharmacol*, 87(5), pp. 782-91.

Keeran K.J., Jeffries K.R., Zetts A.D., Taylor J., Kozlov S., Hunt T.J. (2017) “A Chronic Cardiac Ischemia Model in Swine Using an Ameroid Constrictor”. *J Vis Exp*, (128), 56190.

Kerber, R.E., Pandian, N. y Taylor, A. (1986) “Late Effects of Coronary Reperfusion on Regional Left Ventricular Function”. *Adv. Cardiol*, 34, pp. 77-84.

Kim SJ., Kuklov A., Crystal GJ. (2011) “In vivo gene delivery of XIAP protects against myocardial apoptosis and infarction following ischemia/reperfusion in conscious rabbits”. *Life Sci*, 88(13-14), pp.572-7.

Kihara, Y., W. Grossman, and J. P. Morgan. (1989) “Direct measurement of changes in intracellular calcium transients during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian” *Heart. Circ. Res*, 65, pp. 1029–1044.

Klabunde R.E. (2017) “Cardiac electrophysiology: normal and ischemic ionic currents and the ECG”. *Adv Physiol Educ*, 41, pp. 29–37.

Kleber, A. G., and Rudy, Y. (2004) “Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias”. *Physiological Reviews*, 84(2), pp. 431-488.

6. Referencias bibliográficas

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

Kloner RA, Jennings RB. (2001) “Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2”. *Circulation*, 104, pp. 3158–3167.

Kong Y, Tannous P, Lu G, Berenji K, Rothermel BA, Olson EN, et al. (2006) “Suppression of class I and II histone deacetylases blunts pressure-overload cardiac hypertrophy”. *Circulation*, 113, pp. 2579–2588.

Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. (2011) “Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment”. *JACC Cardiovasc Imaging*, 4(1), pp. 98-108.

Konstantinidis K., Russell S., Whelan R.S., and Kitsis R.N. (2012) “Mechanisms of Cell Death in Heart Disease”. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(7), pp. 2-20.

Krenning G., Elisabeth M. Zeisberg E.M., and Kalluri R. (2010) “The Origin of Fibroblasts and Mechanism of Cardiac Fibrosis”. *J Cell Physiol*, 225(3), pp. 631–637.

Kumar M., Kasala ER., Bodduluru LN, Dahiya V., Sharma D., Kumar V, Lahkar M. (2016) “Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation”. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 76, pp. 221-230.

Kumar, V., Abbas, A.K. y Aster, J.C. (2018) *Robbins Patología humana*. 10º ed. Barcelona: Elsevier.

Lau DH, Linz D, Schotten U, Mahajan R, Sanders P, Kalman JM. (2017) “Pathophysiology of paroxysmal and persistent atrial fibrillation: rotors, foci and fibrosis. *Heart Lung Circ*, 26, pp. 887-93.

Lavandero S., Troncoso R., Rothermel B.A., Martinet W., Sadoshima J., Hill J.A. (2013) “Cardiovascular autophagy: Concepts, controversies, and perspectives”. *Autophagy*, 9, pp. 1455-1466.

Lazar E, Benedek T, Korodi S, Rat N, Lo J, Benedek I. (2018) “Stem cell-derived exosomes – an emerging tool for myocardial regeneration”. *World J Stem Cells*, 10(8), pp. 106-115.

Lazdunski M., Frelin C., Vigne P. (1985) “The sodium-hydrogen exchange system in cardiac cells : its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH”. *J Mol Cell Cardiol*, 17, pp.1029-1042.

Lee TM, Lin MS, Chang NC. (2007) “Inhibition of histone deacetylase on ventricular remodeling in infarcted rats”. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(2), pp. H968-77.

Lee, J. A., and D. G. Allen. (1992) “Changes in intracellular free calcium concentration during long exposures to simulated ischemia in isolated mammalian ventricular muscle”. *Circ. Res*, 71, pp. 58–69.

Lerch, R. y R Benzi, R. (1990) “Physiopathological basis of protection of the ischemic myocardium”. *Circ Res*, 71(3), pp.567-76.

Liao R, Podesser B.K., Lim C.C. (2012) “The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping”. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(2), pp. H156-67.

Lindsey M.L., Bolli R., Cauty J.M., Xiao-Jun Du, Frangogiannis N.G., Frantz S., Gourdie R.G., Holmes J.W., Jones S.P., Kloner R.A., Lefer D.J., Liao R., Murphy E., Ping P, Przyklenk K., Recchia F.A., Schwartz Longacre L, Ripplinger C.M., Van Eyk J.E., Gerd Heusch G. (2018) “Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction”. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 314, pp. H812–H838.

Liu F, Levin M.D., Petrenko N.B., Lu M., Wang T., Yuan L.J., Stout A.L., Epstein J.A., Patel V.V. (2008) “Histone-deacetylase inhibition reverses atrial arrhythmia inducibility and fibrosis in cardiac hypertrophy independent of angiotensin”. *J Mol Cell Cardiol*, 45(6), pp.715-23.

Lopez, A.D., Adair, T. (2019) “Is the long-term decline in cardiovascular-disease mortality in high-income countries over? Evidence from national vital statistics”. *Int. J. Epidemiol*, 48, pp. 1815–1823.

Lucchesi B.R., Burmeister W.E., Lomas T.E., Abrams G.D. (1976) “Ischemic changes in the canine heart as affected by dimethyl quaternary analog of propranolol. UM-272 (SC-27761)”. *J Pharmacol Exp Ther*, 199(2), pp.310-28.

Lukács, E.; Magyari, B.; Töth, L.; Petrasi, Z.; Repa, I.; Koller, A.; Horváth, I.G. (2012) “Overview of large animal myocardial infarction models (review)”. *Acta Physiol. Hung*, 99, pp. 365–381.

6. Referencias bibliográficas

Lyu X, Hu M, Peng J, Zhang X and Sanders Y. (2019) “HDAC inhibitors as antifibrotic drugs in cardiac and pulmonary fibrosis”. *Ther Adv Chronic Dis*, 10, pp. 1-19.

Ma Y., Iyer R.P., Jung M., Czubryt M.P., and Lindsey M.L. (2017) “Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge “gap””. *Trends Pharmacol Sci*, 38(5), pp. 448-458.

Mair, J.; Lindahl, B.; Hammarsten, O.; Müller, C.; Giannitsis, E.; Huber, K.; Möckel, M.; Plebani, M.; Thygesen, K.; Jaffe, A.S.; et al. (2018) “How is cardiac troponin released from injured myocardium?” *Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care*, 7, pp. 553–560.

Maxwell, M.P.; Hearse, D.J.; Yellon, D.M. (1978) “Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischemia: A critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction”. *Cardiovasc. Res*, 21, pp. 737–746.

Mayer AG. (1908) “Rhythmical pulsation in scyphomedusae. II”. In: *Papers from the Marine Biological Laboratory at Tortugas*. Washington, p. 115–131.

McKinsey T.A. (2012) “Therapeutic potential for HDAC inhibitors in the heart”. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 52, pp.303–19.

Meeran Nagoor M.F., Laham F., Azimullah S., Tariq S., Ojha S. (2019) “ α -Bisabolol abrogates isoproterenol-induced myocardial infarction by inhibiting mitochondrial dysfunction and intrinsic pathway of apoptosis in rats”. *Mol Cell Biochem*, 453(1-2), pp. 89-102.

Mines GR. (1913) “On dynamic equilibrium in the heart”. *J Physiol*, 46, pp. 349–382.

Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S. (2006) “Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts”. *Circ Res*, 98, pp. 801-810.

Moe GK, Abildskov JA. (1959) “Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge”. *Am Heart J*, 58, pp. 59-70.

Moe GK. (1962) “On the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. Arch Int Pharmacodyn Ther, 140, pp. 183-8.

Moreu-Burgos J. y Macaya-Miguel C. (2007) “Fisiopatología del miocardio isquémico. Importancia de la frecuencia cardiaca”. *Rev Esp Cardiol Supl*, 7, pp.19D-25D.

- Murtha L.A., Schuliga M.J., Mabotuwana N.S., Hardy S.A., Waters D.W., Burgess J.K. Knight D.A. and Boyle A.J. (2017) “The Processes and Mechanisms of Cardiac and Pulmonary Fibrosis”. *Front Physiol*, 12 (8), 777, pp. 1-15.
- Myerburg RJ and Junttila MJ. (2012) “Sudden cardiac death caused by coronary heart disease”. *Circulation*, 125 (8), pp.1043-1052.
- Ng J, Goldberger JJ. (2007) “Understanding and interpreting Dominant frequency analysis of AF electrograms”. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 18, 680-685.
- Nachlas M.M and Shnitka T.K. (1963) “Macroscopic Identification of Early Myocardial Infarcts by Alterations in Dehydrogenase Activity”. *Am J Pathol*, 42(4), pp. 379–405.
- Nakamura F., Minamino T., Higashino Y., Ito H., Fujii K., Fujita T., Nagano M., Higaki J., Ogihara T. (1992) “Cardiac free wall rupture in acute myocardial infarction: Ameliorative effect of coronary reperfusion”. *Clin Cardiol*, 15, pp. 244-250.
- Nakatsuchi Y, Minamino T, Fujii K, Negoro S. (1994) “Clinicopathological characterization of cardiac free wall rupture in patients with acute myocardial infarction: Difference between early and late phase rupture”. *Int J Cardiol*, 47, pp. S33-S38.
- Neely JR, Liebermeister H, Battersby EJ, Morgan HE. (1967) “Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart”. *Am J Physiol*, 212, pp. 804–814.
- Nerbonne, J.M.; Kass, R.S. (2005) “Molecular Physiology of Cardiac Repolarization”. *Physiol. Rev*, 85, pp. 1205–1253.
- Nguyen T.P., Qu Z., and Weiss J.N. (2014) “Cardiac Fibrosis and Arrhythmogenesis: The Road to Repair is Paved with Perils”. *J Mol Cell Cardiol*, 70, pp. 83–91.
- Nguyen My-Nhan, Kiriazis H., Gao XM., Du XJ. (2017) “Cardiac Fibrosis and Arrhythmogenesis”. *Compr Physiol*, 7(3), pp. 1009-1049.
- Noguchi-Yachide T. (2016) “BET Bromodomain as a Target of Epigenetic Therapy”. *Chem. Pharm. Bull*, 64, pp. 540–547.

6. Referencias bibliográficas

Núñez J., Bayés-Genís A., Zannad F., Rossignol P., Núñez E., Bodí V., Miñana G., Santas E., Chorro FJ., Mollar A., Carratalá A., Navarro J., Górriz JL., Lupón J., Husser O., Metra M., Sanchis J. (2018) “Long-Term Potassium Monitoring and Dynamics in Heart Failure and Risk of Mortality”. *Circulation*, 27;137(13), pp. 1320-1330.

Nural-Guvener H.F., Zakharova L., Nimlos J., Popovic S., Mastroeni D., Gaballa M.A. (2014) “HDAC class I inhibitor, Mocetinostat, reverses cardiac fibrosis in heart failure and diminishes CD90+ cardiac myofibroblast activation”. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 7:10.

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

Panfilov AV. (2006) “Is heart size a factor in ventricular fibrillation? Or how close are rabbit and human hearts?”. *Heart Rhythm*, 3, pp. 862-864.

Park C., Xiao X., Allen D. G. (1999) “Changes in intracellular Na⁺ and pH in rat heart during ischemia: role of Na⁺/H⁺ exchanger”. *Am. J. Physiol*, 276, pp. H1581- H1590.

Parviz Y., Vijayan S., Lavi S. (2017) “A review of strategies for infarct size reduction during acute myocardial infarction”. *Cardiovasc Revasc Med*,18(5), pp. 374-383.

Pérez-Torres, I., Torres-Narváez, J.C., Guarner-Lans, V., Díaz-Díaz, E., Perezpeña-Diazconti, M., Romero, A., and Manzano-Pech, L. (2019) “Myocardial Protection from Ischemia-Reperfusion Damage by the Antioxidant Effect of Hibiscus sabdariffa Linnaeus on Metabolic Syndrome Rats”. *Oxid Med Cell Longev*, 26, pp.1-13.

Pierce W.S., Carter D.R., McGavran M.H., Waldhausen J.A. (1973) “Modification of myocardial infarct volume. An experimental study in the dog”. *Arch Surg*, 107(5), pp.682-7.

Prabhu S.D. and Frangogiannis N.G. (2016) “The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis”. *Circ Res*,119(1), pp. 91-112.

Pu J, Boyden PA. (1997) “Alterations of Na⁺ currents in myocytes from epicardial border zone of the infarcted heart. A possible ionic mechanism for reduced excitability and postrepolarization refractoriness. *Circ. Res*, 81, pp.110 -119.

Rai V., Sharma P., Agrawal S., Agrawal DK. (2017) “Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research”. *Mol Cell Biochem*, 424, pp. 123-145.

Rajtik T., Carnicka S., Szobi A., Giricz Z., O-Uchi J., Hassova V., Svec P., Ferdinandy P., Ravingerova T., Adameova A. (2016) “Oxidative activation of CaMKII δ in acute myocardial ischemia/reperfusion injury: A role of angiotensin AT1 receptor-NOX2 signaling axis”. *Eur J Pharmacol*, 15, 771, pp. 114-22.

Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo docencia. Ministerio de la Presidencia. Boletín Oficial del Estado, núm 34, de 8 de febrero de 2013. Referencia: BOE-A-2013-1337.

Reimer, K., Lowe, J.E., Rasmussen, M.M., Jennings, R.B. (1977) “The Wavefront Phenomenon of Ischemic Cell Death. 1. Myocardial Infarct Size vs Duration of Coronary Occlusion in Dogs”. *Circulation*, 56, pp. 786-794.

Reimer RA., Rasmussen MM., Jennings RB. (1973) “Reduction by propranolol of myocardial necrosis following temporary coronary artery occlusion in dogs”. *Circ Res*, 33, (353).

Riascos D, Baltaxe E, Pascual G. (2004) “La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido”. *Universitas Médica*, 45, pp. 111-117.

Richardson WJ., Clarke SA., Quinn TA., Holmes JW. (2015) “Physiological implications of myocardial scar structure”. *Compr Physiol*, 5 (4), pp.1877-909.

A) Ríos-Navarro, C.; Hueso, L.; Díaz, A.; Marcos-Garcés, V.; Bonanad, C.; Ruiz-Sauri, A.; Vila, J.M.; Sanz, M.J.; Chorro, F.J.; Piqueras, L.; et al. (2020) “Role of antiangiogenic VEGF-A165b in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction”. *Rev. Esp. Cardiol.*, pp. 30161–30164.

B) Rios-Navarro C., Ortega M., Marcos-Garces V., Gavara J., de Dios E., Perez-Sole N., Chorro F.J., Bodi V., Ruiz-Sauri A. (2020) “Interstitial changes after reperfused myocardial infarction in swine: morphometric and genetic analysis”. *BMC Vet Res*, 16 (1), pp. 262.

Ríos-Navarro C, Hueso L, Miñana G, Núñez J, Ruiz-Saurí A, Sanz MJ, Cánoves J, Chorro FJ, Piqueras L, Bodí V. (2018) “Coronary Serum Obtained

6. Referencias bibliográficas

After Myocardial Infarction Induces Angiogenesis and Microvascular Obstruction Repair. Role of Hypoxia-inducible Factor-1^α". *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 71(6), pp.440-449.

Robinson, N.B.; Krieger, K.; Khan, F.M.; Huffman, W.; Chang, M.; Naik, A.; Yongle, R.; Hameed, I.; Krieger, K.; Girardi, L.N.; et al. (2019) "The current state of animal models in research: A review". *Int. J. Surg*, 72, pp. 9–13.

Rodríguez-Sinovas A. y Cinca J. (1999) "Isquemia miocárdica y arritmias ventriculares en modelos experimentales: mecanismos desencadenantes". *Rev Esp Cardiol*, 52, pp. 851-859.

Rohr S. (2009) "Myofibroblasts in diseased hearts: new players in cardiac arrhythmias?". *Heart Rhythm*, 6, pp. 848 -856.

Rohr S. (2012) "Arrhythmogenic implications of fibroblast-myocyte interactions". *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 5(2), pp. 442-52.

Romero L, Carbonell B, Trenor B, Rodriguez B, Saiz J, Ferrero JM. (2010) "Human and rabbit inter-species comparison of ionic mechanisms of arrhythmic risk: A simulation study". *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, pp. 3253-3256.

A) Sanchís Forés J., Bodí Peris V. y Llácer Escorihuela A. (2007a) "Cardiopatía isquémica. Angina estable". En Chorro F.J, García Civera R., López Merino V., eds. *Cardiología clínica*. 1^a edición. Valencia: Publicacions de la Universitat de València (PUV), pp. 681-696.

B) Sanchís Forés J., Bodí Peris V. y Llácer Escorihuela A. (2007b) "Síndromes coronarios agudos. Síndrome coronario agudo sin elevación del ST". En Chorro F.J., García Civera R., López Merino V., eds. *Cardiología clínica*. 1^a edición. Valencia: Publicacions de la Universitat de València (PUV), pp. 697-709.

C) Sanchís Forés J., Bodí Peris V. y Llácer Escorihuela A. (2007 c) "Infarto agudo de miocardio con elevación del ST. Complicaciones del infarto agudo. Estratificación del riesgo". En Chorro F.J, García Civera R., López Merino V., eds. *Cardiología clínica*. 1^a edición. Valencia: Publicacions de la Universitat de València (PUV), 711-736.

Santos, J.V., Souza, J., Valente, J., Alonso, V., Ramalho, A., Viana, J., Ricciardi, W., Freitas, A. (2019) "The state of health in the European Union

(EU-28) in 2017: An analysis of the burden of diseases and injuries”. *Eur. J. Public Health*, 30, pp. 590–595.

Schotten U, Neuberger HR, Allesie MA. (2003) “The role of atrial dilatation in the domestication of atrial fibrillation. *Prog Biophys Mol Biol*, 82, pp. 151-62.

Scirica B.M. y Morrow D.A. (2016) “Infarto de miocardio con elevación del ST: anatomía patológica, fisiopatología y manifestaciones clínicas” en Mann D.L., Zipes D.P., Libby P., Bonow R.O. and Braunwald E. *Braunwald tratado de cardiología. Texto de medicina cardiovascular*. 10ª edición. España: Elsevier S.L.U. pp. 1029-1056.

Scholz B, Schulte JS, Hamer S, Himmler K, Pluteanu F, Seidl MD, Stein J, Wardelmann E, Hammer E, Völker U, Müller FU. (2019) “HDAC (Histone Deacetylase) inhibitor valproic acid attenuates atrial remodeling and delays the onset of atrial fibrillation in mice”. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 12(3), e007071.

Schuetze K.B, McKinsey T.A. and Long C.S. (2014) “Targeting Cardiac Fibroblasts to Treat Fibrosis of the Heart: Focus on HDACs”. *J Mol Cell Cardiol*, 70, pp.100–107.

Shapiro M. (1979) *Infarto agudo del miocardio*. 3ª edición. México o Barcelona: Compañía Editorial Continental, S.A.

Sharifi-Sanjani M, Shoushtari AH, Quiroz M, et al. (2014) “Cardiac CD47 drives left ventricular heart failure through Ca²⁺-CaMKII-regulated induction of HDAC3”. *J Am Heart Assoc*, 3: e000670.

Shinde A.V. and Frangogiannis N.G (2014) “Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair”. *J Mol Cell Cardiol*, 0, pp. 74–82.

Silvestre, J. S. (2016) “Stem cell therapy for cardiovascular diseases”. *Artery Research*, 16, pp. 45–45.

Soler C. (2018) *Implicación del canal K_{ATP} en las modificaciones que la realización de ejercicio físico crónico produce sobre algunas propiedades electrofisiológicas en el miocardio. Estudio en corazón aislado sometido a isquemia global aguda*. Tesis doctoral. Universitat de València-Estudi General.

6. Referencias bibliográficas

Souders C.A., Bowers S.L.K., and Baudino T.A. (2009) “Cardiac Fibroblast: The Renaissance Cell”. *Circ Res*, 105(12), pp.1164–1176.

Spach MS, Boineau JP. (1997) “Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections”. *PACE*, 20 (2 pt 2), pp. 397-413.

Spach MS, Kootsey JM. (1985) “Relating the sodium current and conductance to the shape of transmembrane and extracellular potentials by simulation: effects of propagation boundaries”. *IEEE Trans Biomed Eng*, 32, pp. 743-755.

Steenbergen, C., Murphy E., Levy L, and. London R. E. (1987) “Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart”. *Circ. Res*, 60, pp. 700–707.

Stevenson W, Soejima K. (2005) “Recording techniques for clinical electrophysiology”. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 16(9), pp. 1017-22.

Such L, Alberola A, Gil F, Bendala E, Viña J, Morcillo E J. (1993) “Effect of glutathione on canine myocardial ischaemia without reperfusion”. *J Pharm Pharmacol*, 45(4), pp.298-302.

Such, L., Morcillo, E., Chorro, F.J., Montoro, A. Alberola, A. Aparicio, F. and Viña, J. (1986) “Beneficial effects of N-acetylcysteine on acute myocardial infarction in open-chest dogs”. *Archivos de Farmacología y Toxicología*, XII, pp. 37- 40.

Such, L., Alberola, A., García, C., Gil, F y Chorro, F.J. (1992) “Bases fisiológicas y farmacológicas de la protección miocárdica en la isquemia e infarto experimental”. En: López Merino, V. *Libro del año de cardiología*. Ed. Sanidad y Ediciones, S. A., 1993. Valencia, pp. 387-402.

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-Estudi General.

Such-Miquel L., Del Canto I., Zarzoso M., Brines L., Soler C., Parra G., Guill A., Alberola A., Such L., Chorro FJ. (2018) “Effects of S-Nitrosoglutathione on Electrophysiological Manifestations of Mechanoelectric Feedback”. *Cardiovasc Toxicol*, 18(6), pp. 520-529.

Such-Miquel L., Brines L., Alberola A.M., Zarzoso M., Chorro FJ., Guerrero J., Parra G., Gallego N., Soler C., Del Canto I., Guill A., Such L. (2018) “Effect of chronic exercise on myocardial electrophysiological heterogeneity and stability. Role of intrinsic cholinergic neurons: A study in the isolated rabbit heart”. *PLoS One*, 13(12), e0209085.

Talman V., Ruskoaho H. (2016) “Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration”. *Cell Tissue Res*, 365 (3), pp. 563–81.

Tang, Y.-P.; Liu, Y.; Fan, Y.-J.; Zhao, Y.-Y.; Feng, J.-Q.; Liu, Y. (2018) “To develop a novel animal model of myocardial infarction: A research imperative”. *Anim. Model. Exp. Med*, 1, pp. 36–39.

Tao H, Shi K-H, Yang J-J, Huang C, Zhan H-Y, Li J. (2014) “Histone deacetylases in cardiac fibrosis: current perspectives for therapy”. *Cellular Signalling*, 26, pp. 521–527.

Teunissen, P.F.; Horrevoets, A.J.; Van Royen, N. (2012) “The coronary collateral circulation: Genetic and environmental determinants in experimental models and humans”. *J. Mol. Cell. Cardiol*, 52, pp. 897–904.

Thiele H., Ohman EM., de Waha-Thiele S., Zeymer U., Desch S. (2019) “Management of cardiogenic shock complicating myocardial infarction: an update 2019”. *Eur Heart J*, 40 (32), pp. 2671-2683.

Thygesen K, Alpert J.S., Jaffe A.S., Chaitman B.R., Bax J.J, Morrow D.A., White H.D., Mickley H., Crea F., Van de Werf F., Bucciarelli-Ducci C., Katus H.A., Pinto F.J., Antman E.M., Hamm C.W., De Caterina R., Januzzi Jr J.L., Apple F.S., Alonso Garcia MA., Richard Underwood S., Canty Jr J.M., Lyon A.R., Devereaux P.J., Zamorano JL., Lindahl B., Weintraub W.S., Newby L.K., Virmani R., Vranckx P., Cutlip D., Gibbons R.J., Smith S.C., Dan Atar, Luepker R.V., Robertson R.M., Bonow R.O., Gabriel Steg P.G., O’Gara P.T. y Keith A.A. Fox. (2019) “Consenso ESC 2018 sobre la cuarta definición universal del infarto de miocardio”. *Rev Esp Cardiol*, 72(1), pp. 72e1-e27.

Tibaut M., Mekiš D. and Petrovič D. (2016) “Pathophysiology of Myocardial Infarction and Acute Management Strategies”. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 14, pp. 150-159.

Timmis A., Townsend N., Gale C.P., Torbica A., Lettino M., Petersen S.E., Mossialos E.A., Maggioni A.P., Kazakiewicz D., May H.T., De Smedt D., Flather M., Zuhlke L., Beltrame J.F., Huculeci R., Tavazzi L., Hindricks G.,

6. Referencias bibliográficas

Bax J, Casadei B., Achenbach S., Wright L. and Vardas P. (2019) “European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019”. *European Heart Journal*, 0 pp. 1-74.

Timmis, A., Townsend, N., Gale, C.P., Torbica, A., Lettino, M., Petersen, S.E., Mossialos, E.A., et al. (2020) “European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019 (Executive Summary)”. On Behalf of the Atlas Writing Group, ESC Atlas of Cardiology is a compendium of cardiovascular statistics compiled by the European Heart Agency, a department of the European Society of Cardiology; Developed in collaboration with the national societies of the European Society of Cardiology member countries. *Eur. Hear. J. Qual. Care Clin. Outcomes*, 6, pp. 7–9.

Thomas SP, Thiagalingam A, Wallace E, Kovoor P, Ross DL. (2005) “Organization of myocardial activation during ventricular fibrillation after myocardial infarction”. *Circulation*, 112, pp. 157-163.

Tian S, Lei I, Gao W, Liu L, Guo Y, Creech J, Herron TJ, Xian S, Ma PX, Eugene Chen Y, Li Y, Alam HB, Wang Z. (2019) “HDAC inhibitor valproic acid protects heart function through Foxm1 pathway after acute myocardial infarction”. *EBioMedicine*, 39, pp.83-94.

Tritto M, Renzullo E, Zagari D, Moretti P. (2019) “Right ventricular free-wall scar: an exceptional source of post-infarction ventricular tachycardia. A case report”. *Eur Heart J Case Rep*, 3, pp. 1-6.

Turer A.T. and Hill J.A. (2010) “Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy”. *Am J Cardiol*, 106, pp.360–368.

Weil B.R., Young R.F., Shen X., Suzuki G., Qu J., Malhotra S., Canty J.M. (2017) “Brief Myocardial Ischemia Produces Cardiac Troponin I Release and Focal Myocyte Apoptosis in the Absence of Pathological Infarction in Swine”. *JACC Basic Transl Sci*, 2(2), pp.105-114.

Vandervelde S., van Amerongen MJ., Tio RA., Petersen AH., van Luyn MJ., Harmsen MC. (2006) “Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused versus non-reperfused murine myocardial infarction”. *Cardiovasc Pathol*, 15(2), pp. 83–90.

Van der Laan A.M., Nahrendorf M., Piek J.J. (2012) “Healing and adverse remodeling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response”. *Heart*, 98(18), pp. 1384-90.

- Van den Borne S. W. M., Diez J., Blankesteijn W.M., Verjans J., Hofstra L. and Narula J. (2010) “Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts”. *Nat. Rev. Cardiol*, 7, pp. 30–37.
- Varga M. (2013) *Textbook of rabbit medicine*. 2^a edición. Inglaterra: Elsevier.
- Vasquez C. and Morley GE. (2012) “The Origin and Arrhythmogenic Potential of Fibroblasts in Cardiac Disease”. *J Cardiovasc Transl Res*, 5(6), pp.760–767.
- Williams SM, Golden-Mason L, Ferguson BS, Katherine BS. Schuetze KB, Cavasin MA, Demos-Davies K, Yeager ME, Stenmark KR, and McKinsey TA. (2014) “Class I HDACs regulate angiotensin II-dependent cardiac fibrosis via fibroblasts and circulating fibrocytes”. *J Moll Cell Cardiol*, 67, pp.112-25.
- Wilkins E., Wilson L., Wickramasinghe K., Bhatnagar P., Rayner M. and Townsend N. (2017) “European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition”. *European Heart Network*, Brussels, pp. 2-188.
- Wu H., Li L., Niu P., Huang X., Liu J., Zhang F., Shen W., Tan W., Wu Y., Huo Y. (2017) “The Structure-function remodeling in rabbit hearts of myocardial infarction”. *Physiol Rep*, 5(12), e13311.
- Wu, S., Chang, G., Gao, L., Jiang, D., Wang, L., Li, G., Luo, X., Qin, S., Guo, X., Zhang, D. (2018) “Trimetazidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy”. *Journal of Molecular Medicine*, 96, pp. 791–806.
- Wu D., Zhang K. and Pengfei Hu P. (2019) “The Role of Autophagy in Acute Myocardial Infarction”. *Front Pharmacol*,10(551), pp.1-10.
- Xie M, and Hill J.A. (2013) “HDAC-dependent Ventricular Remodeling”. *Trends Cardiovasc Med*, 23(6), pp. 229–235.
- Xie M, Tang Y, Hill JA. (2019) “HDAC inhibition as a therapeutic strategy in myocardial ischemia/reperfusion injury”. *J Mol Cell Cardiol*, 129, pp.188-192.
- Xie M, Morales CR, Lavandero S, Hill JA. (2011) “Tuning flux: autophagy as a target of heart disease therapy. Current opinion in cardiology”. 26, pp. 216-222.
- Yoon S., Kang G., and Eom GH. (2019) “HDAC Inhibitors: Therapeutic Potential in Fibrosis-Associated Human Diseases”. *Int J Mol Sci*, 20(6), pp. 1-15.

6. Referencias bibliográficas

Zaragoza, L. Such, A. Alberola, M. Martí, J. González and E. Morcillo (1988). *Medical Science Research (IRCS)*, 16, pp. 41-42.

Yuan Y., Du W., Liu J., Ma W., Zhang L., Du Z., Cai B. (2018) “Stem Cell-Derived exosome in cardiovascular diseases: macro roles of micro particles”. *Front Pharmacol*, 9, 547.

Zarzoso M, Such-Miquel L, Parra G, Brines-Ferrando L, Such L, Chorro FJ, Guerrero J, Guill A, O'Connor JE, Alberola A. (2012) “The training-induced changes on automatism, conduction and myocardial refractoriness are not mediated by parasympathetic postganglionic neurons activity”. *Eur J Appl Physiol*, 112(6), pp. 2185-93.

Zeng L, Zhou MM. (2002) “Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain”. *FEBS Lett*, 513, pp. 124-8.

Zhang L, Qin X, Zhao Y, et al (2012) “Inhibition of histone HDACs preserves myocardial performance and prevents cardiac remodeling through stimulation of endogenous angiomyogenesis”. *J Pharmacol Exp Ther*, 341, pp. 285-93.

Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, et al. (2002) “Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy”. *Cell*, 110, pp. 479–488.

Zhang Y, Gao F, Tang Y, Xiao J, Li C, Ouyang Y, Hou Y. (2018) “Valproic acid regulates Ang II-induced pericyte-myofibroblast *trans*-differentiation via MAPK/ERK pathway”. *Am J Transl Res*, 10(7), pp. 1976-1989.

Zhao TC, Cheng G, Zhang LX, Tseng YT, Padbury JF. (2007) “Inhibition of histone deacetylases triggers pharmacologic preconditioning effects against myocardial ischemic injury”. *Cardiovasc Res*, 76, pp. 473 -481.

Zimmer Heinz-Gerd. (1998) “The isolated perfused heart and its pioneers”. *News Physiol Sci*, 13, pp. 203-210.

Capítulo 7

PUBLICACIONES

7. Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

7.1 Artículos científicos

- Genovés P., Arias Mutis OJ., Parra G., Such-Miquel L., Zarzoso M., Del Canto I., Díaz A., Blanch E., Alberola A., Such L., Chorro FJ. (2020) “Development and Long-Term Follow-Up of an Experimental Model of Myocardial Infarction in Rabbits”. *Animals*, 10 - 576, pp. 1 – 19.

7.2 Congresos científicos

1. **Autores:** Genovés P., Arias-Mutis O., Parra G., Such-Miquel L., Zarzoso M., Del Canto I., Alberola A., Muñoz M., Such L., Chorro FJ.
Título: Development of a model of chronic infarction (six weeks) in rabbits to investigate the inducibility of reentrant arrhythmias.
Tipo de participación: Comunicación oral.
Congreso: XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas – Sociedad Española de Ciencia Fisiológicas.
Publicación: Journal of Physiology and Biochemistry, 2018; 74, 1-99 (o3-04).
Lugar de celebración: Cádiz, Andalucía, España.
Año: 2018 (18-21 de septiembre).
2. **Autores:** Serulle K., Arias-Mutis O., Genovés P., Parra G., Alberola A., Such-Miquel L., Zarzoso M., Soler C., Del Canto I., Muñoz M., Chorro FJ., Such L.
Título: Study of the intrinsic electrophysiological stability of the ventricular myocardium in a model of chronic myocardial infarction in rabbits.
Tipo de participación: Comunicación oral.
Congreso: XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas – Sociedad Española de Ciencia Fisiológicas.
Publicación: Journal of Physiology and Biochemistry, 2018; 74, 1-99 (o3-06).
Lugar de celebración: Cádiz, Andalucía, España.
Año: 2018 (18-21 de septiembre).