

DEPARTAMENT FISIOLOGIA

EFFECTES ELECTROFISIOLÒGICS MIOCÀRDICS
INTRINSECS SOBRE L'AUTOMATISME, LA CONDUCCIÓ I
LA REFRACTARIETAT PRODUÏTS PER LA REALITZACIÓ
D'UN PROTOCOL D'ENTRENAMENT. ESTUDI
EXPERIMENTAL

FRANCISCA PELECHANO RIBES

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 18 de juliol de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Francisco Javier Salazar Aparicio
- D. Álvaro Tormos Ferrando
- D. Jose Antonio López Calbet
- D. Francisco Javier Miranda Alonso
- D. Francisco Javier Chorro Gascó

Va ser dirigida per:

D. Antonio Alberola Aguilar

D. Luis Such Miquel

©Copyright: Servei de Publicacions
Francisca Pelechano Ribes

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7294-4

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE FISIOLÒGIA



EFFECTES ELECTROFISIOLÒGICS MIOCÀRDICS INTRÍNSECES
SOBRE L'AUTOMATISME, LA CONDUCCIÓ
I LA REFRACTARIETAT PRODUÏTS PER LA REALITZACIÓ
D'UN PROTOCOL D'ENTRENAMENT. ESTUDI EXPERIMENTAL.

TESI DOCTORAL

Presentada per :
Francisca Pelechano Ribes

Dirigida per :
Dr. Antonio Alberola Aguilar
Dr. Luis Such Miquel

València, 2008

Índex

SIGLES I ABREVIATURES	5
1. INTRODUCCIÓ	8
1.1. Objectius.....	9
1.2. Justificació dels objectius (antecedents).....	9
1.2.1. Electrofisiologia cel·lular miocàrdica: aspectes fonamentals. Activació elèctrica cardíaca.....	9
1.2.1.1. Automatisme sinusal i conducció de l'impuls elèctric cardíac. Bases iòniques.....	12
1.2.1.2. Modificacions de l'excitabilitat miocàrdica durant el potencial d'acció (refractarietat): Bases iòniques.....	32
1.2.2. Modificacions electrofisiològiques cardíques produïdes per l'entrenament.....	41
1.2.2.1. Adaptacions a l'entrenament: generalitats.....	42
1.2.2.2. Adaptacions cardíques: generalitats.....	50
1.2.2.3. Adaptacions electrofisiològiques miocàrdiques.....	55
1.2.2.4. Modificacions intrínseques de l'automatisme, conducció i refractarietat miocàrdiques ventricular.....	67
1.2.3. Estudi especial de la freqüència de la fibril·lació ventricular induïda, com a paràmetre electrofisiològic d'excitabilitat.....	76
1.3. Resum de la justificació dels objectius.....	85
1.4. Hipòtesi.....	86
1.5. Plans de treball.....	86

2. MATERIAL I MÈTODES	88
2.1. Material.....	89
2.1.1. Animals d'experimentació: característiques.....	89
2.1.2. Reactius.....	89
2.1.3. Aparells.....	91
2.2. Mètodes.....	97
2.2.1. Protocol d'entrenament dels animals.....	97
2.2.2. Estudi electrofisiològic.....	99
2.2.2.1. Preparació experimental.....	99
2.2.2.2. Definició i determinació dels paràmetres a investigar....	102
2.2.2.3. Grup d'estudi.....	124
2.2.2.4. Protocol experimental.....	124
2.3. Anàlisi estadística.....	126
2.4. Legislació.....	127
3. RESULTATS	128
3.1. Automatisme.....	129
3.2. Conducció.....	130
3.3. Refractarietat.....	133
3.4. Freqüència de la fibril·lació ventricular.....	140
3.5. Concentració plasmàtica de lactat.....	141
3.6. Expressió miocàrdica d'HSP60 i iNOS.....	143

3.7. Automatismes <i>in vivo</i>	144
3.8. Flux dels cors	144
3.9. Pes dels cors	145
3.10. Annex.....	146
4. DISCUSSIÓ	152
4.1. Consideracions generals.....	153
4.2. Consideracions respecte a la metodologia.....	154
4.3. Consideracions respecte als resultats.....	158
4.3.1. Respecte a l'automatisme.....	158
4.3.2. Respecte a la conducció.....	159
4.3.3. Respecte a la refractarietat.....	163
4.3.4. Respecte a la freqüència de la fibril·lació ventricular.....	175
4.3.5. Respecte a la concentració de lactat plasmàtic.....	177
4.3.6. Consideracions finals respecte als resultats obtinguts.....	184
4.4. Limitacions metodològiques.....	186
5. CONCLUSIONS	191
6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	194

Sigles i abreviatures

Sigles i abreviatures.

AV	—	Auriculoventricular.
DEP	—	Densitat de l'espectre de potència.
DPA	—	Duració del potencial d'acció.
FA	—	Fibril·lació auricular.
FrD	—	Freqüència dominant del senyal fibril·latori.
FrDMàx	—	Freqüència dominant màxima de la senyal fibril·latori.
FrDMín	—	Freqüència dominant mínima del senyal fibril·latori.
FV	—	Fibril·lació ventricular.
EL	—	Longitud d'ona.
PA	—	Potencial d'acció.
PREA	—	Període refractari efectiu auricular.
PRFA	—	Període refractari funcional auricular.
PRE	—	Període refractari efectiu.
PRF	—	Període refractari funcional.
PRR	—	Període refractari relatiu.
PRSCAV	—	Període refractari del sistema de conducció auriculoventricular.
PRSCVA	—	Període refractari del sistema de conducció ventriculoauricular.
PREV	—	Període refractari efectiu ventricular.
PRFV	—	Període refractari funcional ventricular.
PSN	—	Període de supernormalitat.
SCAV	—	Sistema de conducció auriculoventricular.

SCVA	—	Sistema de conducció ventriculoauricular.
TEEA	—	Test de l'extraestímul auricular.
TEEV	—	Test de l'extraestímul ventricular.
VA	—	Ventriculoauricular.
VC	—	Velocitat de conducció.

Canals iònics:

I_{Ca}	—	Corrent d'entrada lenta de Ca^{2+} .
I_{CaL}	—	Corrent de Ca^{2+} de llarga duració.
I_{CaT}	—	Corrent de Ca^{2+} transitori.
I_f	—	Corrents marcapassos.
I_K	—	Rectificador retardat.
$I_{K_{Ach}}$	—	Corrent de K^+ sensible a l'acetilcolina.
$I_{K_{ATP}}$	—	Corrent de K^+ regulada per ATP.
I_{Kh}	—	Canal marcapassos.
I_{K_p}	—	Corrent de K^+ en la fase d'altiplà.
I_{K_r}	—	Corrent rectificador tardà, ràpid.
I_{K_s}	—	Corrent rectificador tardà, lent.
$I_{K_{Ur}}$	—	Corrent rectificador tardà, ultraràpid.
I_{K_1}	—	Corrent rectificador intern.
I_{Na}	—	Corrent ràpid d'entrada de Na^{2+} .
I_{sus}	—	Corrent repolaritzant de K^+ d'inactivació lenta.
I_{to}	—	Corrent transitori d'eixida de K^+ .

CAPÍTOL 1

Introducció

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Objectius

Investigar en cors aïllats de conill l'efecte de l'entrenament sobre:

A) L'automatisme sinusal, la conducció auriculoventricular (AV) i la velocitat de conducció ventricular.

B) La refractarietat auricular, ventricular i del sistema de conducció AV i ventriculoauricular (VA).

C) La freqüència dominant de la fibril·lació ventricular induïda.

D) La longitud d'ona del procés d'activació.

Com a objectiu complementari de la present tesi, ens vam proposar quantificar la concentració plasmàtica de lactat en els animals sotmesos al protocol d'entrenament, en un intent de tipificar l'esmentat entrenament.

1.2. Justificació dels objectius (antecedents)

1.2.1. Electrofisiologia cel·lular miocàrdica: aspectes fonamentals. Activació elèctrica cardíaca

En el cor hi ha certs mecanismes especials que determinen el ritme i la transmissió dels potencials d'acció per tot el múscul cardíac, per a produir el batec rítmic del cor.

Així, el cor està compost per tres tipus principals de miocardi: múscul auricular, múscul ventricular i les fibres musculars excitadores i conductores especialitzades. Els tipus de múscul auricular i ventricular es contrauen en gran manera de la mateixa manera que el múscul esquelètic, amb la diferència que la duració de la contracció és molt major. Al contrari, les fibres excitadores i conductores especialitzades es contrauen només dèbilment pel fet que contenen poques fibres contràctils; en compte d'això, mostren ritme i diverses velocitats de conducció, proporcionant un sistema d'estimulació cardíaca que controla el batec rítmic.

Algunes fibres cardíques tenen la capacitat d'autoexcitació, un procés que pot causar una descàrrega i una contracció rítmica automàtica. Açò és especialment cert en el cas de les fibres del sistema especialitzat de conducció del cor; la porció d'aquest sistema que mostra la major capacitat d'autoexcitació és la formada per les fibres del node sinusal. Per aquesta raó, el node sinusal habitualment controla el batec de tot el cor.

Aquest sistema electrogènic especialitzat genera rítmicament impulsos que produïxen la contracció rítmica de múscul cardíac i condueixen aquests impulsos amb rapidesa

per tot el cor. Quan aquest sistema funciona normalment, les aurícules es contrauen aproximadament una setena de segon abans que els ventricles, la qual cosa permet l'ompliment dels ventricles abans que bombegen la sang als pulmons i a la circulació perifèrica. Un altre aspecte important del sistema és que permet que totes les parts dels ventricles es contrauen quasi simultàniament, la qual cosa resulta essencial per a una generació eficaç de pressió en les cavitats ventriculars.

El sistema especialitzat d'autoexcitació i conducció del cor que controla les contraccions cardíaques està format per:

- El nòdul sinusal també denominat node sinusal, sinoauricular o nòdul SA, en el qual es genera l'impuls rítmic normal.
- Les vies internodulars que condueixen l'impuls des del nòdul sinusal fins a l'auriculoventricular (AV).
- El nòdul auriculoventricular (AV), en el qual l'impuls procedent de les aurícules es demora abans de passar als ventricles.
- El feix de His, que condueix l'impuls de les aurícules als ventricles.
- Els feixos dret i esquerre de l'esmentat feix i les fibres de Purkinje, que condueixen l'impuls cardíac a totes les parts dels ventricles (pres de Guyton, 2001).

1.2.1.1. Automatisme sinusal i conducció de l'impuls elèctric cardíac. Bases iòniques

Com es conegut, existeixen dos propietats rellevants del teixit especialitzat del cor que són l'automatisme i la conducció.

A) L'automatisme sinusal

Ja fa dos segles Galvani i Volta van demostrar que els fenòmens elèctrics participen en l'automatisme miocàrdic, és a dir, de les contraccions espontànies del cor. L'automatisme és una característica de determinades cèl·lules dels nodes sinoauricular (SA) i auriculoventricular (AV) i del sistema de conducció especialitzat ventricular, i es deu a la despolarització lenta de la membrana durant la fase 4, és a dir, és la despolarització diastòlica espontània de les seves cèl·lules marcapassos o cèl·lules P (*pacemaker*).

En la figura 1.1. podem observar una representació esquemàtica de les variacions regionals de la forma del potencial d'acció i en les quals s'evidencia la despolarització diastòlica, açò és sinusal i nodal.

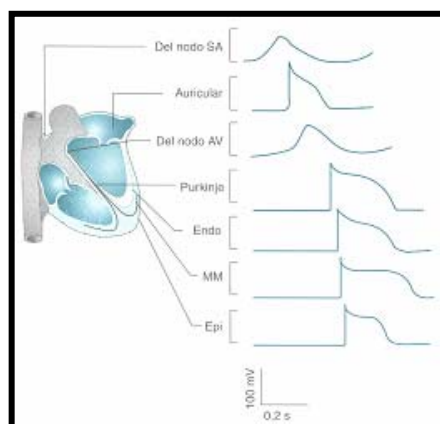


Fig. 1.1. La forma de les ones del potencial d'acció varia en diferents regions del cor. Els potencials d'acció estan desplaçats en el temps per reflectir la seqüència temporal de la propagació. Pres de Zipes i Jalife, 2006.

Com acabem d'exposar, l'automatisme sinusal és la característica crucial del node sinoauricular, encara que compartida amb altres grups cèl·lules miocàrdiques. El node sinusal és una tira xicoteta, aplanada i el·lipsoide de múscul especialitzat d'uns 3 mm d'ample, 15 mm de llarg i 1 mm de gruix que està situat en la paret superolateral posterior de l'aurícula dreta immediatament per davall i un poc lateral respecte a la desembocadura de la vena cava superior. Les fibres d'aquest nòdul manquen quasi per complet de filaments contràctils i mesuren cada una de 3 a 5 micres de diàmetre, la qual cosa contrasta amb el diàmetre de 10 a 15 micres de les fibres del múscul auricular circumdant. Les fibres del node sinusal es connecten directament amb les fibres musculars de l'aurícula de manera que qualsevol potencial d'acció (PA) que comença en el node sinusal, es propaga immediatament a la paret muscular auricular.

La despolarització diastòlica espontània de les cèl·lules marcapassos o cèl·lules P del node sinusal comença a succeir quan la diferència de potencial de la membrana aconseguix els -65 mV aproximadament i s'aconsegueix el PA de la cèl·lula als -40 mV amb l'inici d'una ràpida

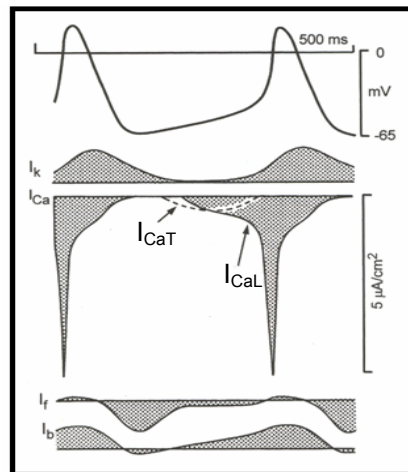


Fig.1.2. Corrents marcapassos en el node sinusal. I_K , rectificador retardat; I_{CaT} , corrent de calci transitori; I_{CaL} , corrent de calci de llarga duració; I_f , corrent d'entrada (marcapassos) i I_b , corrent d'entrada (inespecífica). Aquest model està basat, però substancialment modificat per Yanagihara *et al.*, 1980, pres d'Opie, 2004.

despolarització. El model d'aquest PA difereix, per exemple, dels PA de les cèl·lules miocàrdiques de treball, com podem observar en la figura 1.2.

Opie (2004) atribueix a una sèrie de **canals** l'evolució temporal del potencial d'acció del **node SA**:

- **Canals de Na^{2+} :**

En el mateix sentit, estudis de *voltage-clamp* en el node sinusal han identificat un corrent d'entrada (I_f) que opera millor en rangs de voltatge més negatius que els que es troben normalment en cèl·lules sinoauriculars. El paper de la I_f com un corrent marcapassos potencial és controvertit. El llindar d'activació de les I_f per a les cèl·lules del node sinoauricular pot ser només de -35 a -45 mV (Opie 2004).

- **Canals de Ca^{2+} :**

Els corrents de Ca^{2+} , que comencen a evidenciar-se entre els -60 i -50mV, són la causa principal de la segona meitat del potencial d'acció del node SA. Algunes vegades aquest corrent és anomenat (I_p). L'activitat d'aquest corrent marcapassos d'entrada pot explicar per què el corrent d'eixida de K^+ decau i les cèl·lules nodals comencen espontàniament a experimentar la despolarització (Irisawa *et al.*, 1993, pres d'Opie 2004).

El canal de Ca^{2+} tipus T és el que s'obri primer atés que la seua activitat s'inicia a un voltatge molt negatiu. El corrent T és responsable principalment de la fase primerenca en la segona meitat de la despolarització diastòlica lenta. Estudis de *voltage-clamp* en cèl·lules del node sinoauricular mostren que el corrent de Ca^{2+} pot separar-se en el component transitori, amb un potencial llindar entre -60 i -50mV i un component de llarga duració amb un llindar aproximadament de -30mV. El corrent de calci transitori (I_{CaT}) del node sinoauricular és inhibida per antagonistes de Ca^{2+} . Experimentalment, encara pot ocórrer una despolarització diastòlica lenta quan els canals transitoris estan completament bloquejats (Hagiwara *et al.*, 1988, pres d'Opie 2004); més lenta del normal perquè els canals de Ca^{2+} tipus L s'obrin més lentament com més positiu és el voltatge.

El corrent d'entrada lenta de Ca^{2+} (I_{Ca}) explica l'última meitat de l'increment lent de la fase de despolarització (Hagiwara *et al.*, 1988, pres d'Opie 2004). El corrent d'entrada en les cèl·lules nodals és bloquejada per un descens de la concentració de Ca^{2+} extracel·lular o per agents antagonistes del calci com verapamil i diltiazem.

- **Canals de K^+ :**

El ràpid començament de la repolarització K^+ dependent aconseguida per l'activació del rectificador retardat del corrent de K^+ , I_K , determina la no existència d'altiplà.

El corrent de K^+ més important en les cèl·lules marcapassos és el rectificador retardat (I_K) mentre que el corrent rectificadora interna (I_{K1}) present en altres tipus cel·lulars, no existeix. Alteracions en la freqüència de flux d'aquest corrent de K^+ (I_K) són importants en el curs del PA del node sinoauricular. Aquest corrent està activat pel llindar de despolarització total aconseguït en el punt més alt del PA, que contribueix a la repolarització, i amb el temps (és temps dependent) decau per a permetre els corrents d'entrada de cations i iniciar la nova ona de despolarització. Aquest fenomen explica per què la caiguda del corrent de K^+ és sovint emfatitzada en descripcions de l'automatisme sinusal.

B) La conducció de l'impuls elèctric cardíac.

S'entén com a conducció auriculoventricular a la capacitat de conduir a tot el cor l'impuls elèctric cardíac generat espontàniament per les cèl·lules especialitzades del cor. La taula següent expressa els valors diferents paràmetres de l'impuls elèctric cardíac en cors de mamífers.

	NS	AURICULA	NAV	PURKINJE	VENTRICLE
Potencial repòs (mV)	-50 a -60	-80 a -90	-60 a -70	-90 a -95	-80 a -90
PA					
Amplitud (mV)	60-70	110-120	70-80	120	110-120
Sobredispar (mV)	0-10	30	5-15	30	30
Duració (ms)	100-300	100-300	100-300	300-500	200-300
V _{max} (V·S)	1-10	100-200	5-15	500-700	100-200
VC (m·s)	<0,05	0,3-0,4	0,1	2-3	0,3-0,4
Diàmetre fibra (µm)	5-10	10-15	1-10	100	10-16

Taula 1.1. Propietats del potencial transmembrana en cors de mamífers. NS: node sinusal; NSA: node auriculoventricular; PA: potencial d'acció i VC: velocitat de conducció. Modificat de Sperelakis N, 1979 per Braunwald, 2005.

B₁) La conducció auricular.

Com ja hem comentat, la conducció de l'impuls cardíac s'inicia al node SA i difon de forma radial per tota l'aurícula dreta al llarg de les fibres miocàrdiques auriculars normals, amb una velocitat de conducció aproximada de 1m/s. Hi ha una via especial, la banda interauricular anterior o fascicle de Bachmann que condueix l'impuls més directament des del nòdul SA fins a l'aurícula esquerra. L'ona d'excitació es propaga en sentit inferior a través de l'aurícula dreta, i acaba per arribar al nòdul AV, que en condicions normals sol ser l'únic accés de l'impuls cardíac als ventricles (pres de Levy *et al.*, 2006).

Des d'una perspectiva electrofisiològica, aquestes cèl·lules són molt resistents a l'increment de la concentració extracel·lular de K^+ , propietat semblant a la del node sinusal.

En els estudis realitzats sobre la conducció auriculoventricular cal destacar el realitzat per Scher *et al.* (1979) en un model d'activació auricular per isòcrones (línies que uneixen zones d'excitació simultània). El model en moviment de les isòcrones mostra com es propaga l'impuls. Aquests estudis van demostrar des d'un punt de vista funcional que no hi ha vies auriculars especialitzades. A més, la paret auricular completa funciona com un sistema que condueix les ones des del node sinusal al node auriculoventricular, i les seves cèl·lules tenen propietats funcionals especialitzades, per la qual cosa no es troben únicament en les vies internodals (pres d'Opie, 2004).

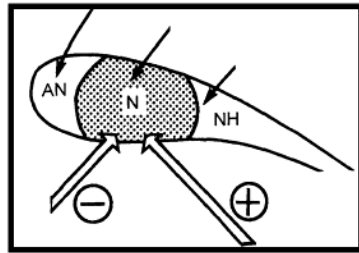
En tot cas, l'impuls nerviós que recorre el territori auricular, no poden arribar directament als ventricles a causa del teixit connectiu que separa les dues cambres cardíques i només pot fer-ho per una via específica de conducció (pres d'Opie, 2004): el node auriculoventricular.

B₂) La conducció nodal.

L'impuls elèctric és arreplegat en el node AV, que es localitza en l'aurícula dreta davall de l'origen de la vàlvula

tricúspide; des d'aquest node, l'impuls continua al llarg de Feix de His.

S'han reconegut tres zones distintes en el node A-V basant-se en la morfologia dels potencials d'acció registrats amb microelèctrodes:



- 1) L'aurículo-nodal (AN)
- 2) El node compacte com a tal (N)
- 3) La node-hisiana (NH)

Fig. 1.3. Esquema del node AV. Modificat d'Opie (2004).

La resposta de la zona N es caracteritza per una pujada relativament lenta de la fase d'ascens i una escassa amplitud del PA. Els potencials d'acció de les zones AN mostren una morfologia intermèdia entre la regió N i el múscul auricular, i els potencials d'acció de les zones NH mostren una morfologia intermèdia entre la regió N i el feix de His (Zipes i Jalife, 2006).

El node AV és l'únic tipus cel·lular important o estructura rellevant del cor que encara no s'ha pogut caracteritzar per mitjà d'un model matemàtic adequat. Els diversos intents d'explicar matemàticament la conducció AV s'han basat en modificacions empíriques dels models ja existents sobre el node sinusal. Això és degut possiblement a l'heterogeneïtat electrofisiològica del mateix, causada per l'heterogeneïtat de

l'expressió dels canals iònics i unions intercel·lulars (Zipes i Jalife, 2006). Aquestes consideracions contrasten amb estudis de Ferrero, 1990 i Chorro *et al.*, 1988, en els quals sí que es quantificava la conducció nodal mitjançant la utilització de dos models matemàtics, encara que no van investigar el mecanisme bàsic de canals.

Zipes i Jalife (2006) atribueixen a una sèrie de **canals** l'evolució temporal del PA **del node AV**:

- **Canals de Na²⁺**:

Petrecca *et al.*, 1997, van aportar dades convincents que els canals iònics de Na²⁺ s'expressen en menor quantia en les cèl·lules de la zona N (compacta del node AV), la qual cosa justifica que el PA d'aquestes cèl·lules siga de menor amplitud i menor velocitat de conducció que el de les cèl·lules de les zones distals del node AV. A més, tenen una àmplia despolarització espontània generada pel corrent I_f, causant de la documentada capacitat de les cèl·lules N d'actuar com a marcapassos (Paes *et al.*, 1961). Les cèl·lules transicionals dels tipus AN i NH, per la seua banda, expressen més I_{Na}, (Petrecca i Shier, 2000; i Petrecca *et al.*, 1997) el que explica l'ascens ràpid del PA i la seua major velocitat de conducció.

- **Canals de Ca^{2+} :**

Els canals càlcics exerceixen un paper important en la conducció pel node AV (Zipes i Méndez, 1973, i Noma *et al.*, 1980), i fins i tot és possible que siguin els responsables de la transmissió de l'impuls en absència de canals de Na^{2+} . En les cèl·lules del node AV s'han trobat els dos tipus de canals, els de tipus L (Munk *et al.* 1996) i els de tipus T (Liu *et al.* 1997) així com els seus respectius corrents I_{CaL} i I_{CaT} .

- **Canals de K^+ :**

Els canals de K^+ també pareixen expressar-se en el node AV de forma irregular. El corrent transitori d'eixida I_{to} , semblant a la I_{Na} , pareix residir principalment en les capes mitjanes del node AV (Munk *et al.*, 1996) mentre que s'expressa en escassa quantia en la regió N (Munk *et al.* 1996). En un estudi clàssic, Noma *et al.*, 1980, van demostrar que el corrent rectificador retardat, I_{K} , és el principal corrent de repolarització en el node AV. Estudis més recents apunten que és el component ràpid, I_{Kr} , el predominant, si no l'únic, del corrent de potassi rectificador retardat (Howarth *et al.*, 1996, Habuchi *et al.*, 1995), contràriament al que succeeix en el node sinusal, hi ha poques dades sobre la presència del component lent, I_{Ks} , en el node AV (Habuchi *et al.*, 1995). D'altra banda, el ben conegut control vagal del node AV (Mazgalev *et al.*, 1986, i Clemo i Belardinelli, 1986) suggerix la influència de la I_{KAch} (Clemo i Belardinelli, 1986) canal de potassi dependent de

l'acetilcolina, regulat pel receptor M2. L'important paper del corrent I_f va quedar fermament demostrat per Noma *et al.*, 1980 i per altres investigadors (Petrecca *et al.*, 1997, i Howarth *et al.*, 1996). El paper dels canals de K^+ de corrent rectificador d'entrada es desconeix.

- **Canals de les unions intercel·lulars:**

Els canals de les unions intercel·lulars exercixen un paper important en la conducció AV. Les dades obtingudes per Zipes i Jalife (2006) suggereixen que l'heterogeneïtat en la distribució de l'expressió de connexines en les diferents zones del node AV (menor expressió en la zona N), podria estar en relació amb l'electrofisiologia de la doble via del node AV, al formar vies de comunicació de cèl·lula a cèl·lula que correspondrien a les vies lenta i ràpida (Nikolski *et al.*, 2003, pres de Zipes i Jalife, 2006).

Clàssicament, s'han descrit diverses **propietats electrofisiològiques del node AV**, les quals són semblants a les del node sinusal.

1) La despolarització diastòlica espontània lenta, amb una descàrrega lenta, que està normalment anul·lada pel node sinusal. No obstant, el node AV pot servir com un marcapàs subsidiari quan el marcapàs del node sinusal falla.

2) La conducció decremental que es produeix quan l'impuls aplega a les fibres miocàrdiques d'unió entre les aurícules i els ventricles observant-se una pausa en la propagació de l'excitació a aquests. Aquest retard nodal permet, com és conegut, que la sístole auricular concloga abans d'iniciar-se l'excitació ventricular.

Inicialment es va discutir molt sobre la localització i el mecanisme del retard en la transmissió de l'impuls a través de la regió auriculoventricular, i només es va poder fer aproximacions amb proves experimentals indirectes (Mountcastle, 1974).

Els estudis preliminars es van realitzar seccionant o comprimint distintes porcions del node i observant la porció més important per al manteniment de la conducció normal als ventricles.

Amb aquest enfocament, diversos investigadors com Erlanger (1912), Eyster i Meek (1916) i Hering (1910) citats per Mountcastle (1974), van demostrar independentment que el retard ocorre amb preferència en la zona auricular del node (zona AN).

Posteriorment, es va intentar explicar el retard de conducció a través del node AV suposant que:

1) Hi havia vies llargues en el node, on la velocitat de conducció era normal, encara que es va demostrar que les vies de conducció tenen una longitud normal, però la velocitat d'aquesta és molt de menor en la zona AN.

2) El període refractari intranodal era prolongat, però no és viable, ja que la duració del PA de les fibres d'unió no és molt major que la de les fibres musculars comunes de l'aurícula.

3) Les propietats de la fibra canvien al llarg de la seva longitud, de tal manera que el PA es fa gradualment menys eficaç com a estímul per a la porció no excitada de la fibra.

Hoffman i Cranefield, 1960 (pres de Mountcastle, 1974) autors que van postular aquesta tercera teoria, van observar que tant l'amplitud com la velocitat de despolarització del PA disminueixen a l'allunyar-se de l'aurícula i ja que l'eficàcia del PA com a estímul per al teixit adjacent depèn tant de la seua magnitud com de la velocitat del seu ascens (Weidmann, 1956, pres de Mountcastle, 1974), aquesta disminució pot causar disminució en la conducció. Les propietats en què podria diferir una fibra respecte a altres en la unió de l'aurícula amb el node, podrien ser considerades alteracions en la persistència o en la capacitat de la membrana, la magnitud del potencial de repòs i el diàmetre i configuració de les fibres. No obstant, se sap que el potencial de repòs de les fibres, en la part superior del node auriculoventricular, és menor que el de les fibres musculars de

l'aurícula i el ventricle (Hoffman i Cranefield, 1960, pres de Mountcastle, 1974).

La major part del retard en la conducció AV pareix ocórrer en el marge auricular del node, a una distància d'un mil·límetre. Quan es fan registres simultanis dels PA amb tres microelèctrodes, un en una fibra auricular, un altre en la zona AN i el tercer en el feix de His del cor aïllat del conill, s'observa que el temps de conducció de l'aurícula a la zona AN del node és prop del doble que el de l'esmentada zona al feix de His. La velocitat de conducció en la zona d'unió entre aurícula i el node AV pot aconseguir valors tan baixos, comparats amb altres zones miocàrdiques, com 0,05 m/s (Mountcastle, 1974).

4) El diàmetre de les fibres miocàrdiques situades en la zona AN és menor que el de les fibres auriculars. Hi ha abundants interconnexions entre les fibres limítrofes (Tawara, 1906, pres de Mountcastle, 1974). En la zona NH el diàmetre de les fibres musculars augmenta gradualment al reduir-s'hi la ramificació d'aquestes fibres. En la taula 1.1 trobem els diferents diàmetres de les fibres i la velocitat de conducció en els diferents teixits cardíacs, tant els específics de la conducció nerviosa com dels diferents tipus de miocardiòcits.

5) El control del nombre i de l'ordre dels impulsos supraventriculars (Opie, 2004), és a dir, que el node pot transmetre impulsos auriculars només fins a certa freqüència, després de la qual hi ha un bloqueig en grau variable. D'altra

banda, la velocitat de transmissió a través del node pot alterar-se per estimulació tant vagal com simpàtica. El lloc del bloqueig de conducció als impulsos auriculars d'alta freqüència i el lloc de l'acció neural pareix ser la zona d'unió entre el teixit auricular i les fibres nodals auriculoventriculares superiors (Hoffmann i Cranefield, 1960, pres de Mountcastle, 1974).

6) Bidireccional, és a dir, posseeix conducció retrògrada.

7) Facilitació i fatiga. El node AV respon d'una forma completa a la freqüència i al tipus d'activació elèctrica (Scher i Spah, 1979, pres d'Opie, 2004). Com en un altre teixit cardíac, hi ha un temps de recuperació: el temps de retard abans del nou impuls, pot ser modificat. A més quan la freqüència del cor és ràpida, avança el temps de recuperació (facilitació). En contrast, impulsos molt ràpids sostinguts disminueix la conducció (fatiga). Aquestes propietats permeten explicar la gran variació en les respostes del node AV, incloent el fenomen del bloqueig AV (Opie, 2004).

B₃) La conducció His-Purkinje.

Les fibres de Purkinje condueixen l'impuls elèctric cardíac al miocardi ventricular. Aquestes fibres tenen característiques funcionals en gran manera oposades a les de les fibres nodals AV. Són fibres molt grans, fins i tot majors que les fibres musculars ventriculars normals i transiten PA a una velocitat d'1,5 a 4,0 m/s, una velocitat unes 6 vegades superior a la del

múscul ventricular habitual i 150 vegades major que la d'algunes fibres del nòdul AV. Açò permet que la transmissió de l'impuls elèctric cardíac per tot el múscul ventricular restant siga quasi immediata.

Es creu que la causa de la rapidesa de transmissió dels PA en les fibres de Purkinje és l'alt nivell de permeabilitat dels ions intercel·lulars comunicants dels discs intercel·lulars, situats entre les successives cèl·lules cardíques que constitueixen les fibres de Purkinje. Per tant els ions passen amb facilitat d'una cèl·lula a la següent, augmentant així la velocitat de transmissió.

Les fibres de Purkinje tenen també molt poques miofibrilles, la qual cosa significa que a penes es contrauen en el transcurs de la transmissió de l'estímul.

Després de travessar el teixit fibrós situat entre el múscul auricular i el ventricular, la porció distal del feix de His es dirigeix cap avall, en el septe interventricular al llarg d'uns 5 a 15 mil·límetres, cap a la punta del cor, com es mostra en la figura 1.1. Després, el feix es divideix en les branques dreta i esquerra, situades davall l'endocardi en les cares corresponents del septe ventricular. Cada branca s'estén cap avall, cap a la punta del ventricle, i es divideix progressivament en branques més xicotetes que rodegen a cada cavitat ventricular i giren cap a la base del cor. Els extrems de les fibres de Purkinje penetren aproximadament un terç del gruix

de la massa muscular, i es posen en contacte amb les fibres del múscul cardíac.

B₄) La conducció Purkinje-ventricles.

Des del moment que l'estímul elèctric cardíac penetra en les branques del feix en el septe ventricular fins que aconseguix les terminacions de les fibres de Purkinje, el temps total transcorregut és de tan sols 0,03 segons generalment; per tant, una vegada que l'impuls cardíac entra en el sistema de Purkinje, es dissemina quasi immediatament a la totalitat de la massa muscular ventricular (Guyton, 2001).

B₅) La conducció ventricular.

Jalife *et al.* (1999), van relatar que quan una cèl·lula es despolaritza, s'estableix un gradient entre aqueixa cèl·lula i la veïna immediata. Així, el corrent generat pel PA en la primera cèl·lula actua com un corrent excitatori per a les cèl·lules contigües.

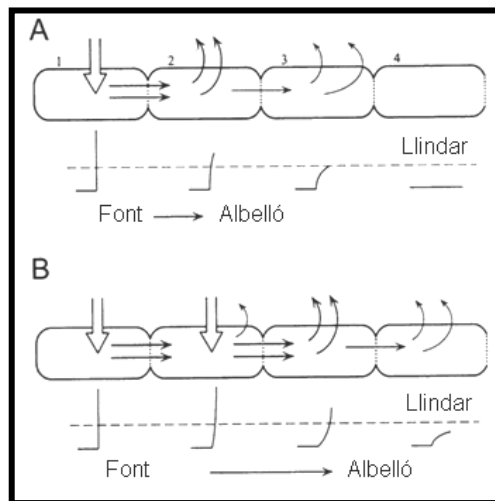


Fig.1.4. Distribució de les càrreges intracel·lulars durant la propagació d'un PA, des de la despolarització (font) a la resta de la cèl·lula (albelló). A) la font està localitzada en la cèl·lula 1; B) l'albelló s'estén a la cèl·lula 2. Modificat de Jalife *et al.*, 1999.

El PA arriba a ser la font del corrent i el potencial de membrana intracel·lular en repòs (de la cèl·lula veïna) constitueix l'abelló. El corrent despolaritzant generat pel PA es propaga electrotonicament com un circuit de corrent local. Per a les cèl·lules que estan lluny de la font, el potencial electrotonic està per davall del llindar i la seua amplitud decau exponencialment amb la distància. No obstant, per a la segona cèl·lula, el corrent font causa una despolarització suficient per a conduir a aquesta cèl·lula, al seu potencial llindar. L'inici d'aquest potencial d'acció genera un nou influx de corrent d'entrada que acaba afectant el conjunt. Aquesta segona cèl·lula afavoreix una font de corrent per a eixes cèl·lules que estan al llarg del trajecte i el procés es repeteix per si mateix, viatjant el PA al llarg de la fibra (fig. 1.4).

En el cas d'una fibra, amb només una fracció del corrent es despolaritza cada cèl·lula, a diferència del miòcit aïllat, on es necessita tot un corrent d'entrada perquè ocórrega aquest fenomen.

Com és conegut, **el miocardi auricular i ventricular** posseeix diferents **propietats electrofisiològiques**, com són comportar-se com un sinciti funcional i l'anisotropia en la conducció de l'impuls nerviós.

A) Sinciti funcional.

És a dir, els corrents iònics flueixen d'una cèl·lula a una altra pràcticament sense resistència.

Estudis microscòpics del teixit muscular del cor demostren que el miocardi està constituït per fibres de forma aproximadament cilíndrica d'uns 100 μm de longitud i d'uns 10 μm de diàmetre (Anderson *et al.*, 1976). Les fibres no estan aïllades unes d'altres, sinó que s'interconnecten en sèrie i en paral·lel mitjançant *túnel*s longitudinals i transversals en els quals hi ha una membrana cel·lular especial (discs intercel·lulars) que separa els citoplasmes i confereix individualitat a cada fibra.

Les unions intercel·lulars o discs intercel·lulars (pres de Guyton, 2001) representen zones de baixa resistència elèctrica (de l'ordre de 400 vegades menor que la d'una membrana cel·lular convencional) gràcies a l'existència en el seu interior d'estructures conductores (nexus) amb alta conductivitat elèctrica.

B) Anisotropia en la conducció.

Saffitz *et al.* (1994) en estudis ultraestructurals del teixit cardíac, descriuen com un miòcit típic està connectat a una mitjana d'altres 11-12 miòcits, i un nombre equivalent de discs intercel·lulars es produeixen entre miòcits adjacents. Com resultat, els fronts d'ona que es propaguen a través del múscul cardíac en direcció transversal (perpendicular a l'eix major de les fibres), troben nombrosos discs intercel·lulars. A causa de la forma cilíndrica dels miòcits individuals, per recórrer una mateixa distància, els fronts d'ona durant la propagació transversal trobaran molts més discs intercel·lulars que els fronts que es propaguen en sentit longitudinal, experimentant, per tant, molta major resistència (Iida *et al.*, 1996). En conseqüència, la velocitat de conducció (VC) en sentit longitudinal és, en condicions normals, unes 3 vegades major que en sentit transversal, creant el PA al propagar-se, isòcrones el·lipsoïdals (Turgeon *et al.*, 1992; Schalij *et al.*, 1992). Aquest fenomen denominat anisotropia en la conducció fa que la propagació dels fronts d'ona siga fortament dependent de l'orientació i connexions entre les fibres (Tsuneiro *et al.*, 1997) i, segons diversos autors (Schalij *et al.*, 1992; Spach *et al.*, 1981; Tsuneiro *et al.*, 1997; García Civera *et al.*, 1999, pres de Ferrero, 2005), es relaciona amb la gènesi d'arítmies per reentrada funcional en determinades circumstàncies, especialment durant la isquèmia (Ranger i Nattel, 1995; Restivo *et al.*, 1995; Heisler i Ferrier, 1996) (pres de Ferrero, 2005).

1.2.1.2. Modificacions de l'excitabilitat miocàrdica durant el potencial d'acció (refractarietat): Bases iòniques

Referent a l'acti-vitat elèctrica del cardiomiòcit ventricular, podem distingir el potencial de repòs i el potencial d'acció (PA); aquest amb diferents fases a causa de la posada en marxa de distints corrents iònics, com podem observar en les figures 1.5, 1.6 i 1.7.

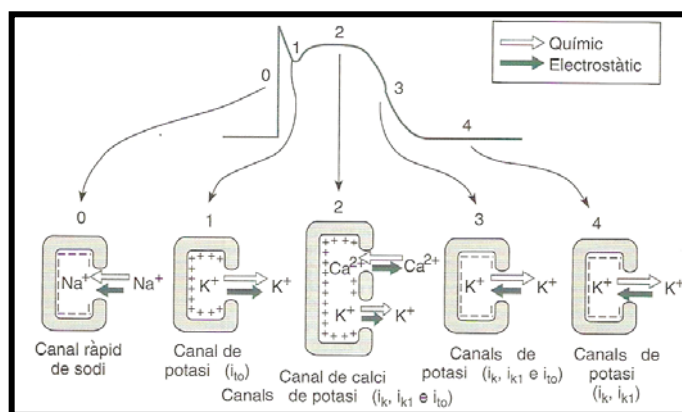


Fig. 1.5. Principals corrents iòniques i canals que generen les distintes fases del PA a una cèl·lula ventricular subepicàrdica. Modificat de Berne i Levy, 2006.

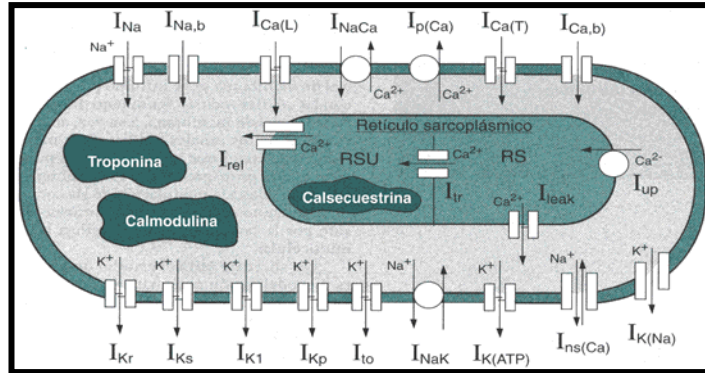


Fig.1.6. Diagrama esquemàtic del model dinàmic de cèl·lula ventricular de Luo-Rudy (MLR); I_{Na} , corrent ràpid de sodi; $I_{Ca(L)}$, corrent de calci per canals de tipus L; $I_{Ca(T)}$, corrent de calci pels canals de tipus T; I_{K_r} , corrent de potassi rectificadora tardana ràpida; I_{K_s} , corrent de potassi rectificadora tardana lenta; I_{to} , corrent d'eixida transitoria; I_{K_1} , corrent de potassi rectificador d'entrada; $I_{K(ATP)}$, corrent de potassi sensible al trifosfat d'adenosina (ATP); I_{K_p} , corrent de potassi en la fase d'altiplà; I_{KNa} , corrent de potassi activat pel sodi (s'activa en situacions de sobrecàrrega de sodi); I_{nsCa} , corrent inespecífic activada pel calci (s'activa en situacions de sobrecàrrega de calci); $I_{Na,b}$, corrent de de sodi de fons; I_{NaK} , corrent de la bomba Na^+/K^+ ; I_{NaCa} , corrent de d'intercanviador Na^+/Ca^{2+} ; I_{pCa} , bomba de calci sarcoplàsmic; I_{up} , captació del calci des del mioplasma al reticle sarcoplasmàtic (RS); I_{rel} , alliberament del calci del reticle sarcoplàsmic d'unió (RSU); I_{leak} , eixida del Ca^{2+} del RS al mioplasma; I_r , translocació del calci del RS a RSU. La calmodulina i la troponina són tampers del calci en el mioplasma. La calsequestrina ho és en el RSU. Kléber i Rudy, 2004, pres de Zipes i Jalife, 2006.

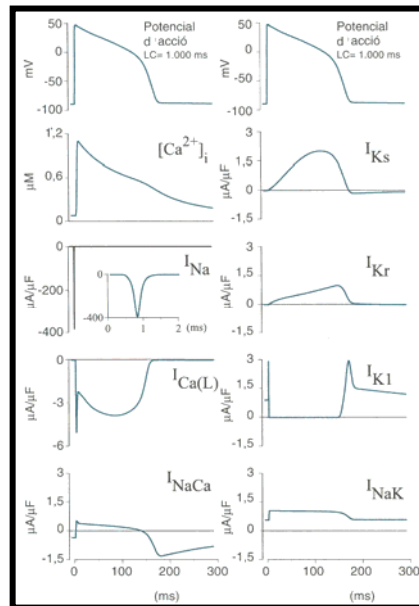


Fig.1.7. Corrents iònics més importants que determinen la morfologia del potencial d'acció (PA). Es mostra el PA (repetit al front de les dos columnes com a referència), els corrents transitoris de calci (concretament de calci lliure en el mioplasma durant el PA) i alguns corrents iònics de membrana determinants de la morfologia del PA (per consultar la definició de les abreviatures veure la fig 1.6). La I_{Na} també es presenta mitjançant una escala ampliada (detall). Totes les xifres deriven del model de simulació dinàmica de Luo-Rudy (MLR). La cèl·lula ha aconseguit l'estat estable per l'estimulació amb una longitud de cicle (LC) d'1.000 ms. Modificat de Kléber i Rudy, 2004, pres de Zipes i Jalife, 2006.

A) Potencial d'acció:

• La **fase de despolarització ràpida** correspon a la despolarització de la cèl·lula i es caracteritza per una forta pendent de pujada ($dV_m/dt = 393 \text{ V/s}$, Kléber i Rudy, 2004), registrant-se una variació

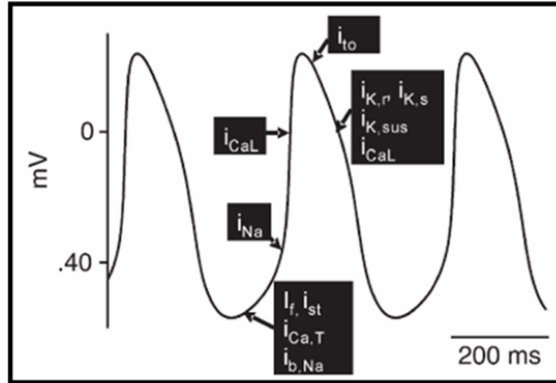


Fig.1.8. Canals iònics implicats en la funció de marcapàs del node sinusal. Lei et al., 2007.

des del valor de potencial electronegatiu propi del repòs, -90 mV, fins a aproximadament +20 mV. Aquesta fase es deu a l'activació del corrent ràpid d'entrada de Na^+ (i_{Na}) que s'inactiva quan la diferència de potencial s'aproxima al potencial d'equilibri del Na (aproximadament a +30 mV) i dura aproximadament entre 1 i 2 ms. *Aquesta fase també és denominada fase 0.* Encara que aquest corrent d'entrada de Na^+ s'ha relacionat solament amb la despolarització de les cèl·lules miocàrdiques no marcapassos, recentment s'han realitzat estudis sobre un corrent d'entrada ràpida d'aquest ió, en les cèl·lules del node sinusal i encara que la seva funció en aquest node és incerta, se sap que aquest corrent si bé no es troba en totes aquestes cèl·lules marcapassos, s'inactiva en potencials de membrana relativament positius, i evidències recents suggereixen una forta correlació entre disfunció del

node sinusal humà i defectes en aquest corrent (Lei *et al.*, 2007).

- **La fase de repolarització ràpida** es deu a la inactivació de la I_{Na} , i a l'activació del corrent transitori d'eixida de K^+ (I_{to}), que s'inactiva de forma dependent del temps i del voltatge. *Aquesta fase també és denominada fase 1.* En les figures 1.9 i 1.10 es mostra el PA d'una cèl·lula subepicàrdica ventricular i el corrent transitori de potassi:

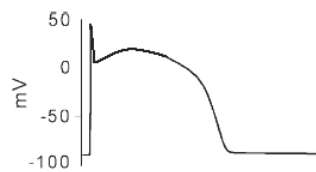


Fig. 1.9. Potencial d'acció d'una cèl·lula subepicàrdica ventricular, amb una longitud del cicle base d'1.000 ms. Modificat Kléber i Rudy, 2004.



Fig. 1.10. Corrent transitori de potassi en el potencial d'acció d'una cèl·lula subepicàrdica ventricular. Modificat de Jalife *et al.*, 1999.

- En la **fase d'altiplà** del PA, el potencial es manté aproximadament constant i es deu a l'activació del voltatge dependent del corrent d'entrada de Ca^{2+} a través dels canals que vehiculen el corrent Ca^{2+} . La seva duració és d'uns 200 ms en les cèl·lules ventriculars humanes, variant d'unes espècies a altres i d'unes condicions a altres. Aquest corrent s'activa quan el potencial de membrana aconseguix uns -25 mV i proveeix un corrent despolaritzant que manté el *plateau* contra l'acció repolaritzant dels corrents I_{kr} i I_{ks} . En el cas de les aurícules humanes i canines, així com en el cor dels ratolins i de les rates, hi ha un corrent addicional, la I_{kur} (com podem observar

en la figura 1.9), que s'activa més ràpidament que la I_{kr} . (Roden *et al.*, 2002). *Aquesta fase també és denominada fase 2.*

- En la **fase de repolarització**, augmenta la velocitat de repolarització fins que el potencial de membrana aconseguix el valor propi del potencial de repòs. Es deu a la inactivació de la I_{Ca} , a la màxima activació dels corrents d'eixida de K^+ de rectificació tardana (I_{kr} e I_{ks}) i a l'activació del corrent de rectificació interna (I_{K1}) en la fase final. També participa en el PA l'activació de d'intercanviador Na^+/Ca^{2+} , que si bé actua de tal manera que produeix una extracció de tres ions Na^+ i introducció d'un ió Ca^{2+} , posteriorment a l'activació de la I_{Ca-L} s'inverteix la seua acció i exerceix un efecte electrogènic positiu que prolonga un poc la duració del PA al final del *plateau*, ja que en aquest cas extrau un ió Ca^{2+} per cada tres ions Na^+ que introdueix. La seua duració aproximada és de 100 ms. *Aquesta fase també és denominada fase 3.*

B) Potencial de repòs:

En les cèl·lules ventriculars s'aconsegueix el valor electronegatiu del potencial de repòs d'una manera estable (a diferència del que ocorre en les cèl·lules marcapassos) i durant un curt temps fins que es produeix la següent despolarització del PA. En aquesta fase intervenen el corrent de rectificació interna (I_{K1}), responsable de mantenir el potencial de repòs prop del potencial d'equilibri del K^+ i d'intercanviador Na/K^+ ,

bomba dependent d'ATP que genera un corrent iònic ($I_{Na/K \text{ pump}}$) a l'expulsar ions Na^+ de la cèl·lula i introduir ions K^+ , amb un relació de 3 ions Na^+ per cada 2 ions K^+ . *Aquesta és la denominada fase 4.*

En els **cardiomiòcits auriculars**, estan presents quasi tots els corrents d'entrada i eixida que hem relatat per als miòcits ventriculars, endocàrdics i epicàrdics, açò és, els corrents que vehiculen les entrades iòniques I_{Na} i I_K , i els corrents d'eixida I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} ,

I_{KATP} , I_{Kp} , I_{Kh} i I_{K1} . A més diferents autors com Clemo i Belardinelli, 1986, (pres de Zipes i Jalife, 2006) i Roden *et al.*, 2002 van relatar que el miocardi auricular també disposa de corrents addicionals com ara la I_{KAch} i I_{KUr} . La velocitat del canvi del PA és directament proporcional a la suma dels corrents iònics transmembrana subjacents.

Els corrents d'entrada despolaritzen la membrana, mentre que els corrents d'eixida contribueixen a la repolarització. En comparació amb el PA auricular, el PA ventricular normalment té una major duració, un major potencial de la fase d'altiplà

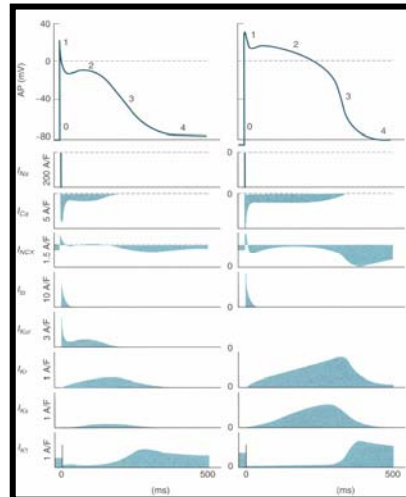


Fig. 1.11. Potencial d'acció cardíac (PA). Miòcits auriculars (esquerra) i ventriculars (dreta). Modificat per Zipes i Jalife, 2006.

(fase 2) i un potencial de membrana de repòs més negatiu (fase 4). La presència d'un corrent de potassi rectificadora retardada ultraràpida (I_{Kur}) en els miòcits auriculars contribueix a la menor fase d'altiplà del PA auricular. El corrent d'entrada de potassi rectificadora (I_{K1}) de les cèl·lules ventriculars permet que hi haja una repolarització de fase 3 més ràpida i un potencial de membrana en repòs més negatiu (fase 4).

Al llarg del PA varia l'**excitabilitat del miocardi**, distingint-se diversos períodes de temps amb diferent excitabilitat. Hoffmann, 1969 (citada per West, 1998), va descriure que:

- El **període refractari absolut** (PRA) pot determinar-se en la cèl·lula aïllada i constitueix el període durant el qual la membrana no pot ser reexcitada per un estímul extern, amb independència de la càrrega elèctrica comunicada. Per tant, l'estímul no és capaç de produir una resposta no sols propagada, sinó tampoc local. En les xarxes de cèl·lules, el PRA no pot determinar-se amb exactitud a causa dels diferents temps de recuperació de les diverses cèl·lules en la xarxa i generalment, es determina el PRE per a aquestes xarxes cel·lulars.

- El **període refractari efectiu** (PRE) d'una cèl·lula o xarxa cel·lular constitueix el període durant el qual només pot produir-se una resposta local per un estímul despolaritzant més

gran del normal. Així, durant el període refractari efectiu, la membrana pot respondre, però no pot generar un PA propagat que transporte l'impuls a través de tota la xarxa cel·lular. Aquest període inclou el període refractari absolut.

- El **període refractari relatiu** (PRR) comença al final del PRE i constitueix l'interval de temps tardà en el PA durant el qual pot generar-se un potencial d'acció propagat però amb un estímul despolaritzant que és major del normal; és a dir, el mínim estímul despolaritzant que puga iniciar un PA propagat.

- El **període supernormal** (PSN) és un curt interval durant el qual la cèl·lula és més excitable del normal; és a dir, que amb un mínim estímul despolaritzant es pot iniciar un PA propagat. El temps de recuperació total constitueix el període des del començament del PA fins al final del període supernormal.

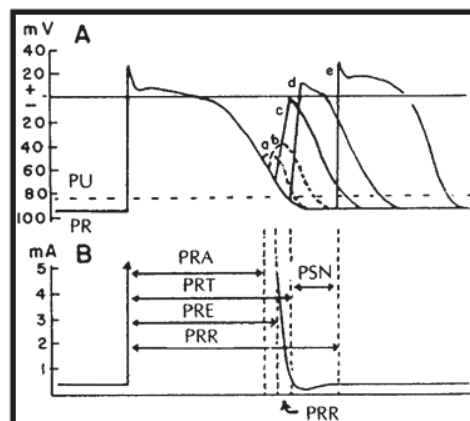


Fig. 1.12. A) PA de membrana normal i respostes a una sèrie d'estímuls aplicats durant i al final de la repolarització i després d'ella. B) Duracions aproximades del període refractari absolut (PRA), període refractari total (PRT), període refractari efectiu (PRE), temps de recuperació total (TRT), període supernormal (PSN) i període refractari relatiu (PRR). West, 1998.

En les cèl·lules d'aquest tipus, que en general condueixen amb rapidesa, la recuperació de l'excitabilitat o refractarietat, és principalment dependent del voltatge, mentre que en les cèl·lules de resposta lenta, en general associades amb una velocitat de conducció lenta, la recuperació és sobretot dependent del temps. D'aquesta manera, en les cèl·lules del tipus de resposta lenta, la repolarització de la cèl·lula cap al seu potencial en repòs no coincideix necessàriament amb la recuperació de l'excitabilitat (West, 1998).

Els **mecanismes iònics** en què es basen els **períodes refractaris** es descriuen a continuació:

- El **PRA** ocorre perquè una vegada el PA s'ha produït, no es disposa de més corrents actives d'entrada per a aconseguir despolaritzar la membrana. Els canals de Na^+ comencen a inactivar-se, a no conduir, durant la despolarització. Des de la inactivació, es requereix un període de recuperació perquè aquests canals puguin començar a conduir novament (Jalife *et al.*, 1999).
- El **PRE**, com ja s'ha dit, s'estén des del començament de la despolarització fins que la membrana s'ha repolaritzat a

un nivell de -50 mV i ocorre perquè no existeix pràcticament moviment d'entrada de Na⁺ (Jalife *et al.*, 1999).

- El **PRR** es produeix a l'avançar la repolarització, quan la diferència de potencial de membrana disminueix de -60 a -70 mV i llavors, com ja s'ha comentat, pot produir-se un PA propagat. A aquest nivell de diferència de potencial de membrana, la taxa de moviment d'entrada de Na⁺ és tan lenta que és necessària una intensitat de corrent molt major perquè el moviment d'entrada de Na⁺ aconseguisca la suficient rapidesa per a generar el PA, que serà de menor voltatge. A més, hi ha un moviment d'eixida d'ions de K⁺ a través de la membrana durant la repolarització, el qual tendeix a contrarestar els efectes del corrent d'entrada de Na⁺ (Mountcastle, 1974).

- El **període de supernormalitat** ocorre, en part, perquè el potencial de membrana retorna als nivells de repòs, en el temps en què suficients canals de Na⁺ són reactivats i el llindar per a l'activació està bastant pròxim al normal (Jalife *et al.*, 1999).

1.2.2. Modificacions electrofisiològiques cardíaques produïdes per l'entrenament

1.2.2.1. Adaptacions a l'entrenament: generalitats

Començarem aquest apartat fent algunes consideracions de tipus conceptual sobre el que s'entén per adaptacions a l'exercici físic (pres de Lamb, 1989).

Als canvis morfològics i/o funcionals induïts per la realització regular d'exercici físic que a més són més o menys duraders, i que preparen millor a l'organisme per a la realització d'exercici, se'ls cataloga com a adaptació fisiològica per a l'esforç. L'adaptació a l'exercici requereix temps (algunes setmanes almenys). «La majoria de les respostes i adaptacions a l'exercici i a l'entrenament són exemples de regulacions *feedback* negatives, aparentment produïdes per a ajudar al cos a minimitzar els canvis homeostàtics que ocorren durant l'exercici».

En l'adaptació **fisiològica a l'entrenament físic** hi ha:

A) D'una banda, una alteració de la constància del Medi Intern, modificant les seves condicions físiques i químiques, la qual cosa és detectada per l'organisme d'alguna manera, el qual a continuació elabora les respostes homeostàtiques de tipus neurohumorohormonal adequades. Açò últim provoca modificacions funcionals en els diferents òrgans i sistemes implicats.

B) D'altra banda, la realització crònica d'exercici crea a més un tipus de senyal que és detectada per l'organisme i que el fa

respondre quan es realitza l'exercici físic agut de manera diferent de com ho faria sense la realització prèvia de l'exercici crònic. En l'esquema que segueix a continuació (fig. 1.13) s'assenyalen les interrelacions creades en el que és la resposta a l'entrenament per exercici físic.



Fig.1.13. Interrelacions que impliquen la resposta a l'exercici i a l'entrenament. Modificat de Lamb, 1989.

L'entrenament físic afecta una sèrie de factors que determinen la capacitat de rendiment (*performance*) físic, la qual cosa implica canvis funcionals i estructurals en una sèrie de sistemes i òrgans (Astrand *et al.*, 2003).

En el procés d'adaptació a l'entrenament i en el de desadaptació o desentrenament, es produeix desplaçament d'equilibri entre processos de síntesi i de ruptura a nivell molecular, i en l'actualitat, constitueix un objectiu prioritari descobrir les rutes de senyalització que regulen aquest balanç (Astrand *et al.*, 2003).

López-Chicharro i Fernández (2001), van relatar alguns aspectes relacionats amb les adaptacions a l'entrenament:

- 1) Cada individu respon d'una manera diferent a cada programa d'entrenament, la qual cosa constata la variabilitat biològica dels subjectes.
- 2) La magnitud de la millora fisiològica o del rendiment depèn de la *capacitat potencial* determinada genèticament i dependent de l'estat físic de la persona, que és el límit d'adaptació d'un teixit o un sistema disponible per al canvi en cada persona.
- 3) El grau de l'adaptació depèn de l'efectivitat dels programes d'entrenament prescrits als subjectes.
- 4) És diferent entrenar per a aconseguir bons resultats esportius, que per a obtenir o mantenir un bon estat de salut i una bona condició física.
- 5) Cal advertir que les adaptacions no s'aconsegueixen amb uns plans genèrics d'entrenament, ja que els efectes són específics del plans d'entrenament utilitzats.

És important diferenciar entre *adaptacions a l'exercici* i *respostes a l'exercici*, així una adaptació és el canvi que apareix a llarg termini, que tarda més temps a desaparèixer i

que es pot manifestar fins i tot en repòs, mentre que una resposta a l'exercici és una modificació aguda i immediata que experimenten els sistemes fisiològics davant d'un estímul, en aquest cas, la realització d'una activitat física.

Així, l'entrenament aeròbic produeix adaptacions a diferents nivells: bioquímic, respiratori, cardiovascular, hormonal, neural i del sistema nerviós vegetatiu, muscular, sanguini, tèrmic i estructural (López-Chicharro i Fernández, 2001).

L'entrenament en persones sanes implica a diferents àrees i processos: màxima captació d'oxigen, funcions hemodinàmiques centrals, funció del sistema nerviós autònom, funció muscular i vascular perifèrica, i capacitat per a l'execució de l'exercici físic submàxim. Totes aquestes adaptacions constitueixen una situació o estat d'entrenament, el qual permet a l'individu realitzar exercici amb un major treball amb menors freqüències cardíaques a qualsevol nivell submàxim d'exercici (Fletcher *et al.*, 2001).

En relació amb l'entrenament aeròbic hem d'indicar una sèrie d'adaptacions entre altres, un augment en el contingut de mioglobina dels músculs involucrats en l'exercici, un augment de la capacitat d'oxidació dels hidrats de carboni, un augment en el



nombre, la grandària i àrea de superfície de les mitocòndries del múscul esquelètic i un increment del nivell d'activitat o de la concentració dels enzims involucrats en el cicle de Krebs i en el sistema de transport d'elèctrons; increment de l'oxidació dels greixos, la qual cosa suposa una menor depleció de glucogen i una menor producció d'àcid làctic.

Els mecanismes fisiològics responsables de la menor acumulació de lactat durant exercicis submàxims encara no es coneixen bé, però es plantegen les possibilitats següents (López-Chicharro i Fernández, 2001):

- 1)** Una major utilització d'àcids grassos com a font metabòlica que conduirà a una menor utilització de glucogen, i per tant a una menor producció de lactat pels músculs.

- 2)** Un menor dèficit d'oxigen a l' inici de l'exercici a causa d'un augment més ràpid del VO_2 , que comporta, també, una menor cúmulo de lactat.

- 3)** Major utilització del lactat com a font energètica durant l'exercici submàxim que provocarà una menor concentració plasmàtica total.

- 4)** Canvis subcel·lulars com l'augment de la massa mitocondrial del múscul.

L'entrenament de resistència també canvia el tipus de l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) muscular, desviant-ho cap a la forma H4 (M4, M3h, M2H2, MH3, H4), o forma cardíaca de LDH, que té menys afinitat per al lactat, amb la qual cosa la formació d'aquest serà menor.

D'altra banda, l'entrenament físic també augmenta l'activitat de l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) i òxid nítric sintasa induïble (iNOS) (Husain i Hazelrigg, 2002).

A nivell cardiovascular, una adaptació central és la major despesa cardíaca que es pot aconseguir amb un exercici màxim, a diferència dels valors submàxims que no solen canviar (Saltin *et al.*, 1968, citat per Fletcher *et al.*, 2001), com en canvi sí que fa la freqüència cardíaca submàxima per l'entrenament, acompanyada aquesta modificació de canvis concomitants del volum sistòlic. En capítols posteriors es comentaran, amb major detall, alguns aspectes generals de les adaptacions cardiovasculars a l'exercici.

En la persona entrenada, és possible l'augment de la despesa cardíaca a costa d'un augment en el despesa sistòlica, més que a un increment de la freqüència cardíaca, ja que la freqüència cardíaca màxima normalment no augmenta en les persones sanes (Hartley *et al.*, 1969).

D'altra banda, Schaible i Scheuer (1985), no van relacionar l'augment del $VO_{2m\acute{a}x}$ només amb adaptacions

cardiovasculars, sinó també amb un augment en la capacitat respiratòria cel·lular, és a dir, a la capacitat mitocondrial.

Pel que fa al sistema nerviós vegetatiu, probablement l'adaptació a l'exercici implica, a part d'un augment del to parasimpàtic, una disminució del to simpàtic, que entre altres formes de manifestar-se està el fet d'uns nivells sanguinis i urinaris de catecolamines més baixos en repòs (Hartley *et al.*, 1972, citats per Fletcher *et al.*, 2001). Així, Bowers *et al.* (1995), van trobar una disminució de les concentracions plasmàtiques de noradrenalina (NA) en repòs (Hespele *et al.*, 1988); i en atletes sotmesos a entrenament durant diversos anys, van trobar un augment dels nivells d'adrenalina (A) en repòs (Kjaer *et al.*, 1986). No obstant, en estudis longitudinals, alguns dels resultats obtinguts són controvertits.

Referent a la sensibilitat a les catecolamines en el cor, Mola, 1978 (pres de Schaible i Scheuer, 1985), relata que en subjectes entrenats, la sensibilitat a les mateixes està augmentada. Això pot ser a causa d'un increment de l'estat inotròpic, ja que va trobar un augment en la velocitat de contracció relacionat amb l'administració d'un β -adrenèrgic com l'isoproterenol.

Són de destacar, així mateix, les modificacions de caràcter endocrí. En línies generals pareix, a la vista de les investigacions realitzades (Astrand *et al.*, 2003), que les modificacions endocrines per l'entrenament, es produeixen

quan aquest ha estat de llarga duració (anys), la qual cosa no ocorre quan l'entrenament s'ha produït en curts períodes de temps. És important assenyalar també que es produeixen canvis en la sensibilitat a les diferents hormones per part de les cèl·lules sobre les quals actuen, com a conseqüència de l'entrenament (Astrand *et al.*, 2003); un exemple el constitueix l'augment de la sensibilitat a la insulina, en teixits com ara els adipòcits, i molt especialment en els músculs esquelètics (James *et al.*, 1985). També s'ha relatat una disminució de la insulínemia per l'entrenament i l'augment de la concentració d'ACTH i del cortisol en corredors intensament entrenats (Wirth *et al.*, 1981), encara que en aquesta última hormona hi ha menys coincidències (Hackney *et al.*, 1988). S'ha vist que la testorèmia disminueix en atletes masculins amb l'entrenament de resistència (Hackney *et al.*, 1988); d'altra banda, altres autors postulen que no hi ha canvis per l'entrenament en els nivells de testosterona, cortisol i hormones tiroïdes (Mujika *et al.*, 1996).

Respecte les hormones del creixement, Eliakim *et al.* (1996), va relatar que un any d'entrenament amplifica l'alliberament pulsatiu de GH en repòs, a diferència de l'entrenament breu, que no fou acompanyat per increments de la dita hormona.

Finalment, respecte a les hormones sexuals femenines i l'entrenament, cal dir que «l'entrenament físic, practicat de forma habitual i amb fins esportius, produeix profunds efectes

sobre el sistema hormonal de les dones i efectes transitoris sobre la capacitat de reproducció femenina» (González, 1992) havent-si detectat «oligomenorrea, amenorrea i retard en la menarquia en atletes entrenades i habituades a l'entrenament físic. S'ha constatat, a més, una relació entre la modalitat esportiva, el grau i intensitat de l'entrenament realitzat i el trastorn menstrual».

1.2.2.2. Adaptacions cardíques: generalitats

Igual que ocorre amb altres teixits com el muscular esquelètic, també el múscul cardíac és sensible a canvis, resultat d'adaptacions, produïdes per la realització regular d'exercici físic.

Una de les modificacions es produeix en la freqüència cardíaca de les persones entrenades en comparació amb les sedentàries. Ja hem fet alguna menció en línies anteriors que la freqüència cardíaca submàxima disminueix també amb l'entrenament. El mateix cal dir d'altres modificacions del tipus de la funció del cor com a bomba, de la capacitat de les cavitats cardíques, etc. Així, Roeske *et al.*, 1976 (pres de Schaible i Scheuer, 1985) van trobar, en la majoria dels esportistes estudiats, un tercer i un quart soroll cardíac.

La disminució de la freqüència cardíaca submàxima s'acompanya generalment d'un augment concomitant del volum sistòlic. Encara que els mecanismes d'aquests canvis no són

coneguts, Fletcher *et al.* (2001) van plantejar la possibilitat que els canvis sobre la funció del cor com a bomba puguin ser deguts a un augment de la contractilitat.

Una altra modificació fou estudiada per Schaible i Scheuer (1985), que van atribuir l'augment del volum sistòlic al mecanisme de la Llei de Frank-Starling, ja que ha estat relatat que la realització d'exercici físic produeix un augment de les cambres cardíques, la qual cosa comporta un increment de la capacitat per a rebre major quantitat de sang. Aqueix augment del retorn venós va seguir, per tant, d'un increment de l'expulsió.

Pelliccia *et al.* (1991) van atribuir que l'augment del volum sistòlic produït per l'entrenament de resistència, es troba relacionat amb l'engrandiment de la grandària de la càmera cardíaca i amb el major ompliment de la mateixa per la sang.

Un altre mecanisme que s'ha tractat d'implicar en l'augment del volum sistòlic és l'augment de l'estat inotrópic del cor en els individus entrenats, i a una taxa elevada d'ompliment del ventricle esquerre en l'inici de la diàstole a freqüències cardíques altes. Però l'evidència d'un augment de la contractilitat en subjectes entrenats durant l'exercici és quelcom contradictòria. Els estudis de Stein *et al.*, 1978 i Anholm *et al.*, 1982 (pres de Schaible i Scheuer, 1985), van mostrar un increment en l'acurtament miocàrdic en subjectes entrenats durant l'exercici que pot haver-s'hi produït sota condicions de

repòs. L'estudi de Bar-Shlomo *et al.*, 1982 (pres de Schaible i Scheuer, 1985), no va mostrar diferències en aquest acurtament en repòs durant l'exercici. Rerych, 1978 (pres de Schaible i Scheuer, 1985) va relatar una disminució de l'acurtament en subjectes entrenats, en repòs, però no van mostrar diferències durant l'exercici. Curiosament, els estudis de Paulsen *et al.*, 1981 i Anholm *et al.*, 1982 (presos de Schaible i Scheuer, 1985) van demostrar, respectivament, un disminució en repòs o increment durant l'activitat en els valors de la velocitat d'acurtament.

L'entrenament produeix canvis en les dimensions cardíques; el grau d'hipertròfia miocàrdica es troba relacionat amb el tipus d'exercici per què s'ha entrenat el subjecte (Astrand *et al.*, 2003). Així, Schaible i Scheuer (1985), van relatar que en atletes de resistència es va produir un augment de la grandària miocàrdica junt amb certs canvis electrocardiogràfics i fonocardiogràfics, d'on deriva el concepte de la síndrome del cor de l'atleta. Aquests canvis poden ocórrer en qüestió d'algunes setmanes (Saltin *et al.*, 1968), però el manteniment de l'augment de la grandària cardíaca fins i tot després de cert temps de relativa inactivitat, requereix haver-s'hi entrenat intensivament durant diversos anys, tal com va assenyalar en una revisió respecte d'això Blomqvist i Saltin (1983). Segons alguns autors, l'entrenament de resistència, ocasiona un augment del volum telediastòlic sense canvis en el grossor de la paret ventricular, la qual sí que va augmentar de grossor amb la realització d'exercicis isomètrics, sense

variacions en el volum ventricular esquerre, com van relatar Blomqvist i Saltin (1983). En posteriors estudis es va relatar que la realització d'exercicis, tant de tipus dinàmic com isomètric, va produir un augment de la massa total ventricular esquerra; però l'augment de la massa normalitzada respecte al pes corporal total o al pes magre total, només es va produir en els entrenaments de resistència (Blomqvist i Saltin, 1983). En estudis experimentals, s'ha vist que segons pareix hi ha una relació de proporcionalitat directa entre la magnitud de la hipertròfia i la duració del programa d'entrenament, i de proporcionalitat inversa amb l'edat (Blomqvist i Saltin, 1983). No estan clars els mecanismes de producció de la hipertròfia en els atletes de resistència, postulant-se distintes causes com són: l'augment de la càrrega, l'augment del volum, l'augment de la pressió, o la prolongada estimulació per catecolamines (Opie, 2004).

En la taula 1.2 es presenta de manera orientativa el que poden ser les diferències que acabem de citar, entre les persones entrenades i no entrenades.

	SEDENTARIS		ENTRENATS	
	REPOS	EXERCICI	REPOS	EXERCICI
FREQÜÈNCIA, batec/min	82	200	58	192
VOLUM SISTOLIC, l/min	0,075	0,112	0,105	0,126
CONSUM OXIGEN, ml/min	300	3,100	300	3,440
DIF. (A-V) O ₂ , ml/l	48,8	138	49,3	140,5

Taula 1.2. Resposta cardiovascular a l'exercici en un subjecte entrenat i en un altre no entrenat (López-Chicharro i Fernández, 2001).

Respecte a la circulació coronària, s'ha descrit un augment en el diàmetre de la llum arterial en les artèries coronàries principals (Currens i White, 1961) en atletes de resistència; així mateix i a nivell experimental, s'ha trobat també un augment del llit vascular coronari (Tepperman i Pearlman, 1961). Per a alguns autors, l'increment en la vascularitat coronària va paral·lel a l'increment de la massa miocàrdica (Schaible i Scheuer, 1981, citats per Blomqvist i Saltin, 1983); mentre que per a altres autors, hi ha augment de la vascularitat fins i tot en absència d'increments en la massa miocàrdica (Blomqvist i Saltin, 1983).

En relació amb l'exercici físic aeròbic, resultats experimentals indiquen que indueix un increment tant en el flux sanguini i capacitat d'intercanvi capil·lar com en la capacitat de difusió coronària (Laughlin, 1994). En els animals entrenats, el producte permeabilitat per superfície capil·lar i el flux sanguini són més alts a una determinada pressió de perfusió perquè la resistència vascular coronària és menor, la qual cosa pot ser a causa de modificacions en l'estructura vascular coronària, a un control modificat de la resistència vascular coronària o a una combinació d'ambdues (Laughlin, 1994). Ha estat descrit que hi ha angiogènesi coronària així com creixement de vasos en longitud i/o diàmetre produït per l'entrenament (Laughlin, 1994). Alguns autors plantegen que l'entrenament podria induir modificacions en la funció vasomotora intrínseca de l'arbre arterial coronari, a través de modificacions mediades per l'endoteli i modificacions en el múscul llis vascular. La pràctica

d'exercici pot produir augment en la vasodilatació dependent d'endoteli en la microcirculació coronària; aquests efectes pareixen resultar d'expressió incrementada de l'òxid nítric sintasa a nivell vascular com anteriorment s'ha comentat. Siga com siga, hi ha evidències que avalen l'existència de vasodilatació dependent d'endoteli en artèries coronàries de conductància com un component de la resposta de la circulació coronària a l'exercici (Laughlin, 1994).

A un nivell més bioquímic i quant a la regulació de les concentracions del Ca^{2+} intracel·lular miocàrdic, Penpargkul *et al.*, 1970 (pres de Schaible i Scheuer, 1985), estudiant el reticle sarcoplàsmic, van trobar un increment en la captació i unió del Ca^{2+} a causa de l'entrenament, així com un augment en l'activitat del reticle, explicat per una relaxació més ràpida dels cors. En quant al paper del sarcolemma, Tibbits *et al.*, 1981 (pres de Schaible i Scheuer, 1985), van trobar que la caiguda de la tensió respecte al temps fou significativament menor en preparacions de múscul papil·lar d'animals entrenats.

1.2.2.3. Adaptacions electrofisiològiques miocàrdiques

El sistema nerviós autònom influeix notablement en el node SA, en l'aurícula i en el node AV, atribuint-se per alguns autors els efectes vagals la responsabilitat de la disminució de l'automatisme del node SA, la disminució de la conducció i la prolongació del període refractari del teixit que el rodeja.

D'altra banda, el sistema nerviós simpàtic exerceix efectes contraris en aquestes propietats (Harrison i Wilson, 1991).

A) Automatisme

La pràctica regular d'exercici físic de resistència produeix canvis en diversos paràmetres cardiovasculars en repòs, sent especialment significatius els canvis sobre l'automatisme i la conducció. Una característica clàssicament descrita de l'efecte de l'entrenament aeròbic sobre les adaptacions cardiovasculars és la disminució de la freqüència cardíaca en repòs i durant exercicis submàxims a valors francament inferiors als que exhibeixen els individus sedentaris (Blumenthal *et al.*, 1990).

Per a la majoria d'autors, la disminució de la freqüència cardíaca és la conseqüència d'una modificació de l'equilibri entre l'acció del sistema nerviós simpàtic i del sistema nerviós parasimpàtic sobre el cor. Blomqvist i Saltin (1983) exposen que l'entrenament pot modificar l'equilibri existent entre els components simpàtic i parasimpàtic del sistema nerviós vegetatiu, produint-se un increment de l'activitat parasimpàtica, com clàssicament àmplies evidències ho han demostrat (Scheuer i Tipton, 1997), la qual cosa es manifesta per una depressió de l'automatisme sinusal i per tant de la freqüència cardíaca. L'entrenament exerceix uns efectes semblants al bloqueig β -adrenèrgic (Brundin *et al.*, 1973, pres d'Opie, 2004).

En algun d'aquests treballs es va publicar que tant la freqüència cardíaca màxima, com mitjana i mínima, d'esportistes joves d'alt nivell eren significativament menors que la dels controls (Palatini *et al.*, 1985, Viitasalo *et al.*, 1982, revisats per Boraita i Serratosa, 1998).

Així, Bedford i Tipton (1987) van observar en un estudi sobre el control barorreflex de la pressió arterial, dut a terme en dos grups de rates, unes sotmeses a entrenament, i un altre grup no entrenat, que el control barorreflex de la freqüència cardíaca es veu atenuat per l'exercici físic, la qual cosa advoca en favor que les modificacions de la freqüència cardíaca per l'entrenament es relacionen amb modificacions del sistema nerviós vegetatiu.

En un estudi dut a terme per Seals i Chase (1989), en humans sotmesos a exercici físic, es va analitzar la variabilitat de la freqüència cardíaca com a índex de to vagal cardíac, i es va trobar que en els humans sotmesos a entrenament es produïa un increment del to vagal, així com xicotetes reduccions en la freqüència cardíaca en repòs.

Furlan *et al.* (1993) van realitzar un estudi en joves sans, amb la finalitat d'investigar els efectes precoços i tardans de l'exercici i de l'entrenament sobre els mecanismes nerviosos que controlen la freqüència cardíaca. Aquests autors van realitzar un estudi sobre un grup d'adults control (no entrenats),

i ho van comparar amb un grup d'atletes durant un període de repòs (desentrenats), i amb un tercer grup d'atletes durant el seu plans d'entrenament. Les mesures realitzades foren la variabilitat de la freqüència cardíaca, els moviments respiratoris i la pressió arterial. Es va realitzar una anàlisi espectral de la variabilitat dels intervals V-V i de l'activitat respiratòria amb l'objectiu d'observar els components freqüencials lligats a l'activitat parasimpàtica i aquells dependents de l'activitat simpàtica. Aquests autors van observar que hi havia una bradicàrdia lligada al component parasimpàtic que coexistia amb signes d'activitat simpàtica augmentada en els atletes en període d'entrenament.

En un altre estudi amb semblants objectius dut a terme per Shi *et al.* (1995), en humans sotmesos a bloquejos farmacològics del sistema nerviós simpàtic amb metoprolol i del parasimpàtic amb atropina, abans i després de ser sotmesos a entrenament físic, van observar que no es produïen modificacions de la freqüència cardíaca quan es bloquejava el sistema nerviós simpàtic i parasimpàtic.

De Schryver *et al.* (1975), van portar a terme un estudi comparant les concentracions d'acetilcolina en el miocardi d'un grup de rates sotmeses a exercici físic, enfront d'un grup control, trobant que l'entrenament produeix un augment del contingut total de les concentracions d'acetilcolina en el cor, per la qual cosa van postular que això podria reflectir un increment en l'activitat nerviosa parasimpàtica sobre el cor. No obstant

aquests autors plantegen com a matèria de controvèrsia si el sistema simpàtic o parasimpàtic influeixen fonamentalment sobre l'activitat del cor en animals exercitats crònicament.

B) Conducció

La coexistència del bloqueig AV tipus I en atletes, amb la disminució de la freqüència cardíaca, recolza que aquest bloqueig és induït per l'entrenament (Bjørnstad *et al.*, 1993a). El fet que la resolució dels bloquejos auriculoventriculars, que apareixen també en atletes (Bjørnstad *et al.*, 1994), pugui ocórrer durant l'exercici, permet atribuir la depressió de la conducció AV per l'entrenament, a un augment del to vagal (Northcote *et al.*, 1989), ja que quan es realitza l'exercici, disminueix l'acció del parasimpàtic i augmenta la del simpàtic.

No sols el cronotropisme està deprimat com a conseqüència de l'entrenament, sinó també el dromotropisme, la qual cosa es manifesta en la conducció AV. Diversos estudis han comprovat la contribució del sistema nerviós autònom i de mecanismes miocàrdics sobre els canvis electrofisiològics observats en humans i en animals de laboratori entrenats.

C) Refractarietat

El paper del sistema nerviós autònom, concretament del sistema nerviós parasimpàtic sobre el miocardi ventricular ha estat objecte de debat durant molt de temps.

Diversos autors atorguen poca rellevància al control parasimpàtic vagal dels ventricles (Randall *et al.*, 1991), en contrast amb més recents investigacions de les que pareix desprendre's una participació parasimpàtica significativa en la funció ventricular.

Efectivament, si bé la importància de la influència parasimpàtica sobre els nodes SA i AV està ben establida des de fa anys (Tcheng, 1951, James i Spence, 1966, Levy i Zieske, 1969, Spear i Moore, 1973, Schmid *et al.*, 1978), els efectes parasimpàtics sobre les propietats electrofisiològiques ventriculars han estat també reconeguts com importants des del punt de vista fisiològic, des de fa poc més de dos dècades (Rardon i Bayley, 1983).

Així mateix, la importància del to parasimpàtic de repòs sobre la refractarietat ventricular hi ha estat plantejada des de fa relativament poc de temps (Prytowsky *et al.*, 1981). Farges *et al.* (1977) van relatar que l'acetilcolina va acurtar el període refractari de les fibres musculars auriculars, però no va modificar la refractarietat en el teixit miocàrdic ventricular, només una disminució paral·lela del període refractari auricular

i ventricular es va produir amb l'administració d'isoproterenol. Morady *et al.* (1988), en un treball realitzat en humans, van observar que l'administració d'atropina acurtava el període refractari efectiu i funcional ventricular, quan s'havia bloquejat el sistema adrenèrgic amb propranolol, i també després de l'administració de diferents dosis d'isoproterenol, sent major l'allargament de la refractarietat quant major era la dosi d'isoproterenol, amb la qual cosa aquests autors van concloure que el to colinèrgic allarga el període refractari ventricular, però en absència d'una activitat simpàtica de fons, i que aquest allargament pot ser accentuat durant l'estimulació β -adrenèrgica.

A diferència dels estudis realitzats al voltant de la segona i tercera dècada i mitjans del segle XX, dels que pareixia desprendre's l'absència d'innervació parasimpàtica en els ventricles de mamífers, estudis més recents suggereixen la presència de fibres nervioses parasimpàtiques més enllà del node auriculoventricular, com van referir Rardon i Bayley (1983). En una revisió realitzada per aquests autors fa un poc més de dues dècades, es va posar de manifest que feia relativament poc de temps que se li reconeixia al sistema nerviós parasimpàtic un paper fisiològicament important sobre la funció ventricular, i que podia també influir significativament sobre les condicions fisiopatològiques responsables de la iniciació i/o de la finalització de certes arítmies ventriculars. La importància del to parasimpàtic en repòs sobre la funció ventricular només fou postulada al voltant dels inicis de la

dècada dels anys 70 (Jose i Taylor, 1969, pres de Rardon i Bayley, 1983).

Si bé els estudis histològics realitzats en les primeres dècades del segle XX apuntaven cap a una absència d'innervació parasimpàtica en el ventricle dels mamífers, treballs més recents apunten cap a una altra direcció. Així, des de fa pocs anys, han estat trobats en la superfície ventricular del cor de diverses espècies de mamífers, inclòs el ser humà, ganglis en la superfície ventricular (Armour *et al.*, 1997 i Pauza *et al.*, 2000) considerats predominantment parasimpàtics i sobre els quals hi ha una important incertesa; de fet s'estan realitzant importants investigacions al respecte en l'actualitat (Johnson *et al.*, 2004). El nostre grup ha sol·licitat un projecte d'investigació per a l'estudi d'aquesta situació.

Encara que se sap des de fa temps que les eferències vagals cap al cor innerven els ganglis parasimpàtics localitzats en les aurícules d'una manera important, generalment s'ha cregut que el control parasimpàtic no s'estenia als ventricles o tenia una mínima rellevància fisiològica (Randall *et al.*, 1991, pres de Johnson *et al.*, 2004). No obstant, i a pesar de les anteriors controvèrsies, la distribució de nervis postganglionars parasimpàtics a moltes regions del cor, incloent a ambdós ventricles, ha estat àmpliament inferida sobre la base d'estudis fisiològics (Johnson *et al.*, 2004). Efectivament, el to vagal augmentat incrementa el llindar de la fibril·lació ventricular i redueix els efectes arritmogènics de l'activitat simpàtica.

Sobre la base de les dades fisiològiques es pot predir, d'alguna manera, que neurones del gangli craneoventricular han de projectar-se al ventricle esquerre i no a altres regions del cor, tal com assenyalen Johnson *et al.* (2004). Segons es dedueix de les investigacions realitzades per aquests autors, encara que els efectes fisiològics mediatos pel gangli craneoventricular són selectius, la font d'eferències vagals al ventricle esquerre no pot ser exclusivament limitada al gangli craneoventricular. Més encara, dos ganglis intraventriculars també intervenen significativament el control vagal de les funcions ventriculars esquerreres, que són el trobat en el septe interventricular i un segon gangli ventricular esquerre.

Hamra i McNeil (1997) van trobar en el miocardi ventricular aïllat (fines seccions de subendocardi ventricular) de gossos sotmesos a exercici físic crònic, i sedentaris, que l'administració d'acetilcolina sola no va modificar la duració del potencial d'acció al 50% i al 90% de la repolarització, a diferència de l'isoproterenol que va accelerar la repolarització, la qual cosa fou antagonitzada per l'administració d'acetilcolina. Segons aquests autors, l'exercici diari crònic no influeix sobre les interaccions adrenèrgiques/colinèrgiques a nivell cel·lular.

Warner i Zipes (1994) van relatar una prolongació de la refractarietat ventricular com a conseqüència de l'augment del to vagal. Un efecte relacionat amb l'anterior observació fou descrit per Vanoli *et al.*, 1991, els que van atribuir un augment

en el llindar de fibril·lació ventricular com un efecte del to vagal augmentat.

Jinbo *et al.* (1998) van observar que, en pacients amb taucicàrdia supraventricular simptomàtica sotmesos a ablació per radiofreqüència, l'increment en contraccions prematures ventriculars en la lesió pròxima al sistema de conducció fou inhibida mitjançant l'activitat tònica parasimpàtica augmentada, ja que les fibres nervioses parasimpàtiques i els seus corresponents receptors es trobaven distribuïts en aquestes zones de lesió.

D) Arítmies

L'entrenament produeix modificacions electrofisiològiques que condueixen a l'aparició de certes arítmies. Talan *et al.* (1982) van observar que les arítmies auriculars foren més freqüents entre els atletes, els quals van presentar una alta prevalença d'extrasístoles auriculars aïllats (100%) i de doblats auriculars (25%), respecte a persones no entrenades (56% i 0%, respectivament). Aquests autors no van trobar diferències estadísticament significatives en la incidència d'extrasístoles ventriculars aïllades o en forma de complexos. El mecanisme responsable de l'alta incidència d'extrasístoles auriculars entre corredors de llarga distància està poc clar actualment. En aquest estudi, Talan *et al.* (1982) van evidenciar que la presència d'arítmies auriculars o ventriculars no es

correlaciona significativament amb la grandària de l'aurícula esquerra i del ventricle esquerre demostrat per ecocardiografia.

En un estudi realitzat per Northcote *et al.* (1989) amb dos grups, un de corredors veterans i un altre control, van observar que alguns dels atletes van presentar un ECG durant l'exercici que complia criteris d'isquèmia (depressió del segment ST major de 1 mm ocorrent als 0,08 segons després del punt J), i d'entre ells, la meitat van presentar una arteriografia coronària normal. Açò supera la previsió per a la població normal lliure de símptomes. Balady *et al.* (1984) citats per Northcote *et al.* (1989) van trobar que el 13% d'atletes entrenats van presentar una depressió del segment ST en l'ECG realitzat en repòs. Pantà i Orieg (1982) citats per Northcote *et al.* (1989) van descriure en corredors ben entrenats una resposta isquèmica a l'exercici, però presentaven una gammagrafia amb TI²⁰¹ de perfusió miocàrdica normal.

Kambara i Phillips (1976) citats per Northcote *et al.* (1989) van suggerir, per a explicar el fals positiu dalt citat, que la repolarització dels ventricles dels atletes no era homogènia. La asimetria de la repolarització pot estar relacionada amb la disminució del to simpàtic. Boraita i Serratosa (1998), van trobar que el patró de repolarització precoç és el típic de l'esportista, associat habitualment amb ones T negatives en V₁ i ones U prominents en derivacions precordials i apareixent habitualment associades a bradicàrdia sinusal. L'interval Q-T corregit per a la freqüència cardíaca, ocasionalment i coincidint

amb alteracions hidroelectrolítiques pot estar allargat. En atletes de grans distàncies i de forma excepcional, poden aparèixer ones T negatives asimètriques i profundes en derivacions electrocardiogràfiques precordials dretes, que es relacionen amb una adaptació de tipus aeròbic en què la vagotonia és responsable d'una heterogeneïtat en el potencial d'acció.

En un estudi realitzat per Boraita i Serratosa (1998), es relata que les arítmies per augment de l'automatisme i les taquiarítmies en l'esportista de competició són escassament i generalment benignes. Per a aquests autors, l'augment dels focus ectòpics pot estar relacionat amb l'augment del to vagal. En l'esmentat estudi, van trobar una freqüència baixa d'extrasístole ventricular en l'electrocardiograma basal i en el de l'esforç, tractant-se d'una extrasistòlia monotòpica d'escassa densitat i també amb criteris de parasistòlia.

Viitasalo (1982), Zehender (1990) i Chamoux (1983), citats per Boraita i Serratosa (1998), van concloure que «l'esport no és un factor arritmogènic i no predisposa a sofrir arítmies ventriculars malignes, pel que no existeixen diferències significatives en la prevalença d'aquestes arítmies respecte a la població general».

Altres autors han investigat l'aparició d'arítmies ventriculars en els atletes. Així Palatini *et al.* (1985) van dur a terme un estudi de la prevalença de les arítmies en dos grups

d'humans; un grup d'aquests eren atletes ben entrenats, l'altre grup (grup control) el componien humans sedentaris. Els resultats d'aquest estudi van mostrar que en el grup dels atletes apareixia un nombre més gran d'extrasístoles ventriculars que podien estar relacionats amb la mort sobtada dels atletes.

1.2.2.4. Modificacions intrínseques de l'automatisme, la conducció i la refractarietat miocàrdiques ventricular

No obstant l'indicat anteriorment, altres autors van assignar indirectament un paper a mecanismes no mediats per factors externs al miocardi, com els responsables de certes modificacions electrofisiològiques per l'entrenament.

A) Automatisme

Northcote *et al.* (1989) van afirmar que la bradicàrdia, més que una modificació adaptativa, podria ser una condició semblant a la malaltia del node sinusal induïda per l'exercici.

Anteriorment, Katona *et al.* (1982) van dur a terme una investigació sobre atletes, per a estudiar els efectes tant del sistema simpàtic com a parasimpàtic sobre la freqüència cardíaca en repòs. En aquesta investigació es va administrar propranolol i atropina al grup d'atletes i també al grup control de persones no entrenades. El resultat fou que la freqüència cardíaca dels atletes tenia un valor significativament menor que la dels components del grup control, després del bloqueig

autònom, per la qual cosa van concloure que la disminució de la freqüència del cor en humans entrenats es deu a una disminució de la freqüència cardíaca intrínseca i no a l'augment del to parasimpàtic.

De la mateixa manera, Lewis *et al.* (1980) van estudiar en ciclistes el component no autonòmic de la bradicàrdia, en repòs i durant l'exercici màxim i submàxim després d'entrenament de resistència a llarg termini, i la freqüència cardíaca del qual van comparar amb la de subjectes no entrenats. Així mateix, van comparar la freqüència cardíaca dels esportistes abans de sotmetre'ls a un bloqueig autonòmic farmacològic i després del bloqueig. En aquest estudi van concloure que en els humans sotmesos a exercici físic de llarga evolució, s'evidenciava un important component no autonòmic de la bradicàrdia tant en repòs com després de l'exercici.

Stein *et al.* (2002) van realitzar una investigació sobre les adaptacions electrofisiològiques intrínseques del node sinusal en atletes ben entrenats als que se'ls va bloquejar els receptors tant β -adrenèrgics, com colinèrgics, és a dir, se'ls va practicar una denervació autònoma farmacològica. Els atletes van presentar uns paràmetres de cronotropisme o automatisme sinusal (longitud del cicle sinusal i temps de recuperació del node sinusal) més llargs que els subjectes control.

No obstant, alguns autors no van trobar modificacions de la freqüència cardíaca en repòs després d'un exercici crònic

en preparacions aïllades; així, Tipton *et al.* (1977) van dur a terme una sèrie d'experiments en un sistema de cor aïllat tipus Langendorff, en cors de rates sotmeses a exercici físic, a fi d'estudiar la bradicàrdia produïda per l'entrenament, encara que els resultats no van poder demostrar la influència de l'exercici físic sobre la freqüència cardíaca.

El nostre grup investigador en treballs previs va suggerir que probablement existeixen mecanismes miocàrdics que poden intervenir també, almenys en part, en l'aparició d'una depressió del cronotropisme sinusal.

Així, Such *et al.* (2002) en un estudi experimental amb conills sotmesos a un protocol d'entrenament van trobar que en el cor aïllat, i per tant no sotmès a influències nervioses extrínseques i/o humorals, la longitud del cicle sinusal bàsic (inversa de la freqüència cardíaca) era major que en els cors aïllats dels conills control no sotmesos a entrenament.

B) Conducció

Respecte a les modificacions en la conducció en atletes degudes a l'entrenament, alguns estudis van trobar bloquejos auriculoventriculars de primer grau, i en menor extensió de segon grau (Talan *et al.*, 1982, Viitasalo *et al.*, 1982 i Viitasalo *et al.*, 1984).

Stein *et al.* (2002), citats prèviament, també van estudiar en atletes ben entrenats els efectes de l'entrenament sobre la conducció AV no mediada pel sistema nerviós autònom. Aquests autors van trobar que tant la longitud del cicle de Wenckebach com la longitud de l'interval A-V eren més llargs en els atletes que en els subjectes control.

Alguns autors recolzen la idea que el bloqueig AV en atletes en general pot ser causat per mecanismes no nerviosos, i per tant del mateix cor, com és el cas d'un dany miocàrdic (Reindell, 1960 citat per Bjørnstad *et al.*, 1993a), o com que van assenyalar una hipertròfia ventricular esquerra, ja que aquests últims autors van trobar una incidència augmentada de bloquejos AV en subjectes amb la mencionada hipertròfia (Bjørnstad *et al.*, 1993b).

Respecte a l'efecte de l'entrenament sobre la conducció auriculoventricular, Such *et al.* (2002) van postular que l'entrenament produeix una depressió de la conducció del node auriculoventricular, que es va manifestar en una major longitud del cicle de Wenckebach en animals entrenats que en els controls. També es va observar una tendència a la disminució de la conducció ventriculoauricular retrògrada en els animals entrenats.

C) Refractarietat

Respecte a l'efecte de l'entrenament físic sobre la refractarietat intrínseca es disposa de poca informació. Such *et al.* (2002), van observar que l'efecte d'un protocol d'entrenament físic en conills, amb una intensitat major a la usada per a la realització de la present tesi doctoral, si bé la refractarietat, tant del sistema de conducció com la del miocardi ventricular de treball, va mostrar una tendència a augmentar, els canvis detectats no foren estadísticament significatius; només el període refractari funcional ventricular fou major en els animals entrenats.

En un treball posterior es va evidenciar l'augment del període refractari efectiu i funcional ventricular mitjançant l'aplicació del test del extraestímul, quan s'utilitzava un tren d'estimulació d'una longitud de cicle que era propera a la longitud del cicle sinusal bàsic (López *et al.*, 2005b). Fins i tot utilitzant altres trens d'estimulació, si bé no va haver-hi modificacions estadísticament significatives de la refractarietat, sí que va seguir manifestant-se una tendència a l'augment de tal paràmetre.

Aquestes últimes investigacions pareixen apuntar que l'entrenament produeix modificacions de caràcter intrínsec d'alguns dels paràmetres que acabem de mencionar. Així, el període refractari efectiu auricular va augmentar significativament usant diferents longituds de tren base

d'estimulació. Encara que amb algunes longituds de tren base d'estimulació no es van aconseguir diferències estadísticament significatives, en general, els valors dels períodes refractaris foren majors en els animals entrenats que en els controls (López *et al.*, 2005a). Aquests efectes contrasten amb els produïts *in vivo* com a conseqüència de l'entrenament. Ens referim al fet que l'entrenament augmenta el to vagal (Blomqvist i Saltin, 1983), que l'acetilcolina acurta el període refractari efectiu auricular (Farges *et al.*, 1977) i, per tant, això suposa un efecte oposat al que hem observat en cor aïllat. És a dir, que d'una banda es desenvolupa un efecte dependent del cor sotmès a control neurohumoral clarament proarítmic i, pareix, que també es desenvolupa un altre de tipus intrínsec amb efecte antiarítmic.

Altres autors van realitzar una investigació de l'efecte de l'entrenament sobre la duració del PA en rates entrenades en la qual van trobar un augment de la duració del PA en els cardiomiòcits procedents del subepicardi de les rates entrenades, i no van trobar cap modificació sobre la duració del potencial d'acció en les cèl·lules subendocàrdiques (Natali *et al.*, 2002).

En l'actualitat es disposa de molt poca informació al respecte de l'entrenament sobre la refractarietat auricular intrínseca, encara que per contrast sí que es coneix l'efecte sobre la refractarietat lligada al control nerviós autònom. El fet conegut que l'exercici físic augmente el to vagal, i que

l'acetilcolina disminuïska el període refractari efectiu auricular (Farges *et al.*, 1977) ens inclina a atorgar una disminució de la refractarietat per l'exercici físic en el cor *in situ*. Contrasten amb el que acabem de dir respecte a aquest efecte de l'entrenament sobre el període refractari auricular, els resultats obtinguts per Mezzani *et al.* (1990) en un estudi realitzat a dos grups de pacients amb Wolf-Parkinson-White. En el grup de pacients entrenats es va observar un període refractari auricular tant d'efectiu com funcional més llarg que en els subjectes control. Aquests autors també van observar que tant la longitud del cicle basal, com el període refractari efectiu del sistema de conducció anterògrad i ventriculoauricular foren més llargs en els subjectes entrenats.

Estudis realitzats en humans sobre les adaptacions electrofisiològiques a l'exercici físic del node AV i del node sinusal, refereixen que atletes sotmesos a bloqueig farmacològic del sistema nerviós autònom, també van presentar una modificació de la refractarietat intrínseca en el sistema de conducció auriculoventricular respecte als subjectes control, també sotmesos a bloqueig del sistema nerviós autònom. Efectivament, el període refractari efectiu del node AV era major en els atletes en situació basal (Stein *et al.*, 2002).

Respecte a la duració del potencial d'acció, hi ha diferents treballs que estudien les possibles modificacions

produïdes per l'entrenament sobre determinats processos electrofisiològics relacionats amb la refractarietat miocàrdica.

Així, Brorson *et al.* (1976), investigant en humans els efectes de l'entrenament sobre el potencial d'acció monofàsic i la refractarietat auricular, van observar un augment de la duració del potencial d'acció en el grup entrenat, atribuïnt-lo a un augment en la concentració intracel·lular de potassi. Altres autors com Tibbits *et al.* (1981), estudiant els efectes de l'entrenament sobre l'adaptació excitació-contracció, van trobar també un augment en la duració del potencial d'acció en el grup entrenat, que tals autors van atribuir a un augment en l'entrada de calci. De la mateixa manera, Gwathmey *et al.* (1990) investigant en rates l'efecte combinat de l'entrenament i de l'envelliment sobre alguns paràmetres fisiològics, van observar un augment del PA en el grup entrenat, explicat amb els mateixos mecanismes.

Respecte a aquest fenomen d'excitació-contracció, Wei *et al.* (1984), van observar en rates de distinta edat una contracció cardíaca més llarga, un major grau de despolarització i un increment en els nivells de calci intracel·lular en el grup de major edat.

Pensem que potser l'augment de la refractarietat produït per la realització d'exercici físic aerobíic siga el que subjau a la baixa incidència de taquiarítmies en esportistes assenyalada per diferents autors (Boraita i Serratos, 1998), sent la

incidència d'extrasistòlia, tant supraventricular com ventricular, inferior a la que es dona en la població juvenil en general; encara que segons l'opinió d'aquests últims autors el predomini vagal no sols estaria implicat en la inhibició dels marcapassos fisiològics sinó també dels focus ectòpics. No obstant, aquests autors suggereixen també un efecte de l'entrenament sobre l'estabilitat elèctrica tant d'aurícules com de ventricles per a explicar la baixa incidència de taquiarítmies, a més de «considerar la possible existència d'un procés de selecció natural que impedisca que els esportistes que les presenten arriben a l'elit per ser exclosos en èpoques primerenques de la competició» (Boraita i Serratosa, 1989).

D) Velocitat de conducció i longitud d'ona

Pel que fa a la velocitat de conducció, si bé els coneixements de què disposem són molt coneguts quan referim aquest paràmetre a la realització de l'exercici físic agut, no hem trobat cap treball d'investigació en què es fera referència a la modificació intrínseca d'aquest paràmetre per l'entrenament.

Segons López *et al.* (2005b), que van estudiar l'efecte d'un protocol d'entrenament, també d'una intensitat major al de la present tesi, a través de la realització d'exercici físic en tapis rodant en conills, sobre la velocitat de conducció miocàrdica ventricular i la longitud d'ona del procés d'activació miocàrdica ventricular van trobar una tendència a l'augment en la longitud d'ona, mentre que la velocitat de conducció no es va modificar.

Com acabem de veure en les línies precedents, no pareix totalment dilucidada la qüestió relativa a si les modificacions electrofisiològiques produïdes per l'entrenament es deuen a mecanismes lligats exclusivament a modificacions en el to del sistema nerviós autònom, exclusivament a mecanismes intrínsecs o a la coexistència d'ambdós tipus de mecanismes.

1.2.3. Estudi especial de la freqüència de la FV induïda, com a paràmetre electrofisiològic d'excitabilitat

Diferents autors han correlacionat algunes característiques de la FV amb la major o menor malignitat de la mateixa.

Segons es desprèn d'aquestes investigacions, hi ha una relació entre alguna de les característiques de la FV i la millor o pitjor situació en què quedaria el cor després de la desaparició de la mateixa, en aquells casos en què s'instaura l'arítmia d'una manera sobtada. A continuació exposarem breument els estudis realitzats que considerem més significatius.

Strohmenger *et al.* (1997) van realitzar un estudi amb el propòsit d'analitzar, si en pacients amb FV extrahospitalària, la freqüència d'aquesta arítmia i l'amplitud de la mateixa eren predictives de cardioversió reeixida trobant que el major voltatge de la FV es va correlacionar amb unes millors possibilitats de cardioversió; mentre que la fibril·lació *fine*

(fibril·lació de poca amplitud i alta freqüència) fou més rebel al tractament. Així mateix, es va correlacionar bé amb el resultat de la cardioversió la freqüència dominant de la FV, trobada gràcies a l'aplicació de la transformada ràpida de Fourier. És a dir, les possibilitats d'èxit es van veure amb valors de freqüència dominant més alts, que aquells obtinguts en la FV el tractament de la qual no havia estat exitós. Un altre paràmetre també analitzat fou la freqüència mitjana amb la qual es va obtenir una bona correlació amb el resultat de la desfibril·lació. Per a aquests autors, la isquèmia progressiva deguda a parada cardíaca resulta en una depleció de fosfàgens (Neumar *et al.*, 1990 citat per Strohmerger *et al.*, 1997) i un deteriorament de l'excitabilitat cel·lular (Zipes, 1975), així com una sobrecàrrega cel·lular de calci (Clusin *et al.*, 1984), la qual cosa declina la freqüència de la FV i incrementa la probabilitat de dissociació electromecànica que segueix a la desfibril·lació (Martin *et al.*, 1986 i Hillsley *et al.*, 1994).

Marn-Pernat *et al.* (2001) van tractar també de trobar un índex pronòstic per a predir l'èxit en l'aplicació de xocs elèctrics, amb la finalitat de restaurar el ritme sinusal cardíac. Aquests autors van validar un algoritme per a predir la probabilitat que un xoc elèctric pogués restaurar un ritme sinusal en el seu model experimental, integrant l'àrea sota l'amplitud de l'espectre de freqüència dins d'un ample de banda que elimina certs artefactes, com és el cas del soroll ambiental, i van obtenir així l'índex AMSA o amplitud de l'àrea de l'espectre:

$$\text{AMSA} = \sum A_i \times F_i$$

On A_i és l'amplitud de la freqüència (F) i-ésima.

No sols va haver-hi una bona correlació entre aquest índex i el bon resultat de la desfibril·lació, en el sentit que l'índex AMSA va permetre orientar cap al temps òptim de la desfibril·lació, sinó que també van trobar una bona correlació amb altres paràmetres predictius, com foren la freqüència mitjana (que és la freqüència que bisecciona l'espectre de potència) i l'amplitud mitjana de la FV, sent aquests dos últims menys discriminatius per a la predicció de xocs amb èxit i sense èxit.

Com és ben sabut, la FV és una arítmia letal l'aparició de la qual implica la pèrdua de la contracció efectiva del cor, l'anul·lació de la despesa cardíaca i la mort sobtada del pacient. Els avenços en el coneixement dels mecanismes bàsics que determinen el seu inici, la seua perpetuació o el seu cessament són necessaris per a intentar progressar en la prevenció de la FV, o en els procediments encaminats a interrompre-la eficaçment.

L'anàlisi de l'activació ventricular durant la FV és complex, a causa de les característiques de l'arítmia i a les limitacions de les tècniques utilitzades per al seu estudi, que ha estat abordat utilitzant mètodes i tècniques diverses (Moe, 1962; Abildskov, 1994; Allessie *et al.*, 1996; Carlisle *et al.*,

1990; Stewart *et al.*, 1996; Chorro *et al.*, 1996; Chorro *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1996; Cha *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 1999; Kwan *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 1998; Chorro *et al.*, 2000a), entre les quals es troben l'anàlisi de les característiques de l'ECG, registres endocàrdics intracel·lulars o dels potencials d'acció monofàsics, l'anàlisi de les característiques espectrals dels senyals fibril·latòries, els estudis basats en tècniques cartogràfiques i la utilització de simulacions per ordinador.

La cartografia epicàrdica de l'activació ventricular emprant elèctrodes múltiples amb què es registren potencials extracel·lulars (Lee *et al.*, 1996; Cha *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 1999; Dillon *et al.*, 1988; Brugada *et al.*, 1990), o sistemes òptics basats en la utilització de marcadors sensibles als canvis de voltatge, i en els quals les variacions en la fluorescència del senyal indiquen els canvis del potencial transmembrana de grups de cèl·lules pròximes entre si (Davidenko *et al.*, 1992; Pertsov *et al.*, 1993; Cabo *et al.*, 1994; Witkowski *et al.*, 1998; Gray 1999; Efimov *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1995), han aportat informació sobre les característiques de l'activació miocàrdica durant les arítmies ventriculars, i han suposat el suport metodològic de diversos treballs sobre la FV, en els quals s'han objectivat els patrons d'activació i l'existència d'activació reentrant, tant en l'inici de l'arítmia, com durant l'evolució de la mateixa (Lee *et al.*, 1996; Cha *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 1999; Kwan *et al.*, 1998, Chorro *et al.*, 2000a, Witkowski *et al.*, 1998, Weiss *et al.*, 1999), sent més limitada la informació disponible

sobre el seu cessament gràcies a procediments diferents de la desfibril·lació elèctrica (Cha *et al.*, 1994).

Els mètodes basats en l'anàlisi del domini de la freqüència, com ara les anàlisis de la potència espectral i de l'espectre de coherència, examinen la distribució de l'energia dels electrogrames com una funció de la freqüència (Ropella, 2001). Per a l'anàlisi espectral pot ser usat un mètode matemàtic, com és el de la transformada ràpida de Fourier; l'anàlisi de Fourier és un mètode no paramètric que descompon els senyals en una suma de components sinusoidals.

Zaitsev *et al.* (2003) van relatar que l'anàlisi de la FV mitjançant la transformada de Fourier proporciona un estudi objectiu, precís i complet de la freqüència dominant. Segons aquests autors, la freqüència de la fibril·lació ventricular és un estimador de la longitud del cicle i de la rapidesa de la FV.

La utilització de tècniques situades en el domini de la freqüència ha ampliat la capacitat d'anàlisi de les ones fibril·latòries obtingudes amb l'ECG de superfície, o per mitjà d'elèctrodes epicàrdics o endocàrdics. En l'espectre de freqüències els components principals dels senyals fibril·latoris s'agrupen en bandes al voltant de valors definits, que es poden identificar amb facilitat i permeten caracteritzar millor les fases evolutives de l'arítmia. Com ha estat comentat en línies anteriors, la informació proporcionada per les tècniques

espectrals i l'obtinguda amb la determinació de paràmetres en el domini del temps, com la mitjana dels intervals V-V durant la FV, són instruments útils per a caracteritzar les accions de diverses situacions, com la que és objecte del present treball.

Diverses són les característiques del poder espectral que han estat analitzades en la FV, per establir el seu caràcter predictiu en relació amb les conseqüències de la mateixa després de la desfibril·lació. Així, com relaten Gazmuri *et al.* (2001) en una revisió respecte d'això, han estat analitzades:

1) La freqüència mitjana, que és la freqüència que bisecciona l'espectre de potència (Strohmenger *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1991; citats per Gazmuri *et al.*, 2001).

2) La freqüència límit, que és la freqüència per davall de la qual resideix el 95% de l'àrea de l'espectre de potència (Strohmenger *et al.*, 1997, citat per Gazmuri *et al.*, 2001).

3) L'anomenat índex AMSA (amplitud de l'àrea de l'espectre), que com anteriorment s'ha explicat, s'obté integrant l'àrea sota l'amplitud de l'espectre de freqüència dins d'un ample de banda que elimina certs artefactes, com és el cas del soroll ambiental (Marn-Pernat *et al.*, 2001).

4) La freqüència dominant, que correspon al màxim espectre de potència (Strohmenger *et al.*, 1997, citat per Gazmuri *et al.*, 2001).

En el present treball es pretén utilitzar aquest últim paràmetre per a la valoració de la FV.

Altres tècniques d'estudi de la FV han estat les basades en l'anàlisi de les característiques de l'electrocardiograma. Així, Moe *et al.* (1941) van analitzar la variació en l'amplitud de les ones de l'ECG, caracteritzant així l'evolució del patró fibril·latori des del seu inici. Sobre aquests criteris s'ha distingit la fibril·lació *fina* (fibril·lació de poca amplitud i alta freqüència) de la *grossera* (fibril·lació de gran amplitud i baixa freqüència), a fi d'establir situacions diferents en l'evolució de la fibril·lació ventricular, conceptes aquests (els de *fina* i *grossera*) la utilitat dels quals ha estat objecte de polèmica. Jones i Klein (1984) van descriure la coexistència d'ambdues morfologies a l'inici de la FV, mentre que als 15 minuts predominava un patró de fibril·lació *fina*. Açò estaria relacionat amb la degeneració de l'excitabilitat cel·lular induïda metabòlicament. Per a altres autors (Weaver *et al.*, 1985), l'amplitud de la fibril·lació es relaciona estretament amb l'èxit després de la cardioversió, així una fibril·lació *fina* indicaria una demora en l'inici del tractament, com ja s'ha apuntat anteriorment.

També han estat utilitzats mètodes d'estudi que s'han basat en l'anàlisi dels potencials d'acció monofàsics, i/o fins i tot en el del registre intracel·lular de potencials d'acció per mitjà de l'ús de microelèctrodes. Aquests últims mètodes han estat de gran utilitat per a aportar informació addicional sobre la

fibril·lació ventricular, la qual origina modificacions en el potencial d'acció, com la disminució del temps de repolarització (Swartz *et al.*, 1993).

Altres estudis s'han basat en tècniques cartogràfiques que permeten l'obtenció d'informació, tant espacial com temporal, sobre l'activació miocàrdica durant les arítmies ventriculars. Gràcies a aquest mètode s'identifiquen els moments d'activació en diferents llocs explorats, construint-se línies isòcrones; també es poden construir mapes isopotencials, és a dir, que mostren les zones amb idèntica amplitud dels voltatges en un moment determinat i, per tant, les variacions dels mateixos al llarg del temps. Aquests procediments suposen el registre d'electrogrames obtinguts amb elèctrodes múltiples epicàrdics, endocàrdics i/o intramiocàrdics. Aquests mètodes han estat emprats per múltiples autors com Ideker *et al.* (1977), Rogers *et al.* (1999), Dillon *et al.* (1988), Brugada *et al.* (1990), Rankovic *et al.* (1999), autors aquests citats per Cànoves (2001).

S'ha observat també que, si no s'interromp la perfusió coronària (perfusió normòxica) es mantenen tant la freqüència dominant de l'espectre (Chorro *et al.*, 1998, Martin *et al.*, 1984 i 1986), com la capacitat d'obtindre una desfibril·lació efectiva sense dissociació electromecànica (Martin *et al.*, 1984 i 1986). En models de cor aïllat, en els quals es manté la perfusió coronària, s'ha comprovat que l'espectre de freqüències dels senyals fibril·latoris roman estable durant períodes de 5 minuts

(Chorro *et al.*, 1998). El mateix succeeix en models canins *in situ* (Martin *et al.*, 1986), en els quals la perfusió coronària es manté amb circulació extracorpòria.

D'altra banda, la utilització de models experimentals en què es manté la perfusió coronària durant la FV, permet mantindre un estat metabòlic adequat durant el desenvolupament de l'arítmia, i excloure aquesta variable a l'hora d'analitzar tant les característiques del patró fibril·latori, com els efectes de diversos fàrmacs o maniobres sobre el mateix (Dorian i Newman, 1997, Chorro *et al.*, 1998, Eggenreich *et al.*, 1996, Burton i Cobbe, 1998).

Estudis realitzats sobre la freqüència dominant de la FV en cors de conills sotmesos a oclusió coronària en un sistema de Langendorff demostren que l'exercici físic pot exercir un efecte beneficiós enfront de l'aparició d'arítmies reentrants en cors isquèmics gràcies a una disminució de l'heterogeneïtat miocàrdica, ja que va haver-hi un augment del coeficient de variació en el grup control als 30 minuts de l'oclusió coronària al comparar amb la situació basal i no va haver-hi canvis en el grup entrenats (Such *et al.*, 2006).

En la present tesi doctoral, es planteja com un dels objectius analitzar la freqüència dominant de la FV induïda, després de la realització d'entrenament, ja que la freqüència dominant és una propietat que es correlaciona bé amb una altra propietat relacionada amb l'aparició d'arítmies per

reentrada i amb la perpetuació de les mateixes, com és la refractarietat miocàrdica.

1.3. Resum de la justificació dels objectius

A la vista de les anteriors observacions en què es planteja la polèmica respecte als mecanismes sobre els quals assenten les modificacions electrofisiològiques miocàrdiques per l'entrenament, i que ens serveixen d'hipòtesi de treball, ens hem plantejat estudiar l'efecte de l'entrenament, sobre l'automatisme sinusal (amb l'anàlisi de la longitud del cicle sinusal), sobre la conducció AV (a través de l'anàlisi de l'interval A-V), sobre la conducció ventricular (mitjançant l'anàlisi de la velocitat de conducció), sobre la refractarietat auricular, ventricular, i del sistema de conducció AV, i ventriculoauricular o retrògrada (amb l'anàlisi dels períodes refractaris) i la fibril·lació ventricular (amb l'anàlisi de la freqüència dominant). Tot açò en una preparació de cor aïllat de conill entrenat amb un protocol d'entrenament d'intensitat de 0,33m/s i amb la finalitat de comprovar si els paràmetres esmentats es modifiquen, i si ho fan en la mateixa direcció que en el cas de l'entrenament amb protocols de major intensitat ja investigats.

1.4. Hipòtesi

Aquests objectius han estat plantejats amb una doble finalitat. D'una banda, si trobarem una modificació dels paràmetres mencionats, tenint en compte que s'hauria demostrat en una preparació de cor aïllat, contribuiríem a assentar d'una manera més definitiva, que «l'exercici físic regular produeix efectes sobre el miocardi no vinculats a control humoral o del sistema nerviós extrínsec i que podrien intervindre en les possibles modificacions del cronotropisme sinusal, conducció AV i ventricular, de la refractarietat auricular, ventricular, i del sistema de conducció auriculoventricular, i ventriculoauricular o retrògrada, i la fibril·lació ventricular».

1.5. Plan de treball

Amb la finalitat d'aconseguir els nostres objectius, realitzem el següent plans de treball:

- 1)** Entrenament dels conills sotmesos a estudi, en tapís rodant.

- 2)** Mantindrem estabulats, sense realitzar exercici, a un altre grup de conills, el mateix temps que dura el període d'entrenament en el grup d'animals entrenats.

- 3)** Després del període d'entrenament i/o estabulació, procedirem a aïllar els cors d'ambdós grups de conills.

4) Estudi dels paràmetres d'automatisme, conducció, refractarietat, freqüència dominant durant la fibril·lació ventricular i concentració de lactat en sang.

5) Finalment, procedirem a comparar entre ambdós grups (control i entrenat) els resultats obtinguts, aplicant els tests estadístics adequats, i extraurem les corresponents conclusions.

CAPÍTOL 2

Material i Mètodes

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. Material

2.1.1. Animals d'experimentació: característiques

El present estudi ha estat realitzat en cors aïllats de conills mascles, de raça Nova Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), alimentats *ad libitum* i amb un pes mitjà a l'inici del protocol d'entrenament o estabulació d' $1,92 \pm 0,18$ Kg.

2.1.2. Reactius

S'han utilitzat els següents reactius i compostos:

- Per a la preparació de la solució de Tyrode: CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , NaH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl i glucosa de Panreac[®] Química S.A.
- Anestèsia: Ketamina (Ketolar[®]) de Parke-Davis.
- Heparinització: Heparina sòdica al 5% de Rovi[®].
- Per a la determinació del lactat: tires reactives Accutrend[®] Lactat que contenen una zona amb reactius indicadors, de Roche.

- Per a la determinació de proteïnes en els extractes citosòlics de múscul cardíac es va utilitzar el Bradford Reagent de la firma BIORAD (Bradford, 1976). Este mètode depèn del canvi en l'absorbància del Blau Comassie G-250 a l'unir-se a proteïnes.

- Per a la determinació de l'expressió de l'enzim iNOS: anticòs Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA.

- Per a la determinació de l'expressió de la proteïna HSP60: anticòs StressGen Biotechnologies Corp.

- Per al revelat de les membranes de *Western-Blottings*: el kit *Protoplot 'Western' Blot AP System*, Promega®, basat en la utilització d'anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa.

- Altres reactius: àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA), tris, glicina, acrilamida, bisacrilamida, àcid clorhídric, sodi dodecil sulfat (SDS), blau de bromofenol, blau comassie, mercaptoetanol, N,N,N,N'-tetrametilnetilenodiamina (TEMU), sèrum Boví Albúmina (BSA), persulfat amònic (APS), DL-ditio-treitol (DTT), fenil metil sulfonil fluoride (PMSF), aprotinina, leupeptina, pepstatina, Tween 20, Nonidet-P40, NaCl, sucrosa, pirofosfat sòdic, NaF.

Els reactius es van obtindre de les firmes: Sigma-Aldrich Química (Espanya), Boehringer Mannheim S.A. (Alemanya),

Panreac, Merck Biochemica (Alemanya), Fisher Scientific Company (USA), Pharmacia Biotech (USA), Intergen Company (USA).

2.1.3. Aparells

- Balança precisa (Precisa Balances®) i balança Soehnle®.
- Tapís rodant Panlab® S.L. (fig. 2.1).



Fig. 2.1. Tapís rodant.

- Equip de mesura Accutrend® Lactat (fig. 2.2).



Fig 2.2. Equip de mesura de lactat, Accutrend® Lactat'.

- Cubetes d'electroforesi, BIORAD®, model Mini-PROTEAN 3Cell.

- Cubetes d'electrotransferència, BIORAD[®], model Mini Trans-Blot Cell.

- Centrífugues, a baixa velocitat, SORVALL[®], model GLC-1 i a alta velocitat, HERAEUS[®], model Sepatech Biofuge 17RS.

- Espectrofotòmetre termostatitzat, KONTRON[®] model Uvikon 810.

- Fonts d'alimentació per a l'electroforesi, SIGMA[®], model PS 250-2, i BIORAD[®], model 200/2.0 PowerSupply.

- Sistema d'anàlisi d'imatges, FUJIFILM[®], model LES-1000 plus.

- Sistema de purificació d'aigua. Marca MILLIPORE, models Milli-Q i Milli-RO.

- pHmetre. El pHmetre emprat és de la marca CRISON, model MicropH 2001, amb un elèctrode incorporat INGLOD.

A) Sistema d'estimulació:

- **Elèctrodes bipolars** d'acer inoxidable per a estimulació elèctrica miocàrdica, amb un diàmetre de 0,125 mm, i distància interelèctrode d'1 mm.

- **Estimulador Grass S88[®]** (Grass Instruments[®], Inc., Quincy, M.A., U.S.A.) proveït d'una unitat d'aïllament d'estímuls



Fig.2.3. Estimulador Grass S88[®]

(SIU5). L'estimulador permet emetre pulsos rectangulars de corrent i en el que podem controlar paràmetres com ara la freqüència d'estimulació, la intensitat i la duració dels

estímuls (fig.2.3).

- **Sistema controlat per computació** connectat a l'estimulador per a estimulació programada.

B) Sistemes de registre:

- **Elèctrode bipolar** de plata amb diàmetre de 0,5 mm i una separació interelèctrode d'1 mm, per al registre de l'auriculograma.

- **Elèctrode múltiple** per a registre dels electrogrames ventriculars, compost de 256 elèctrodes unipolars d'acer inoxidable, d'un diàmetre 0,125 mm, i una distància interelèctrode d'1 mm (fig.2.4).



Fig. 2.4. Electrode múltiple de registre.

- Sistema de cartografia epicàrdica de l'activitat elèctrica utilitzat ha estat :

El **Maptech**[®] (Waalre, Holanda), que va ser utilitzat per al processat dels registres electrogràfics. Els electrogrames es



Fig. 2.5. Sistema de cartografia MAPTECH[®]

van amplificar amb un guany de 100 a 300, es van filtrar eliminant les freqüències situades fora de la banda compresa entre 1-400 Hz i es multiplexaren. La freqüència de mostratge en cada canal va ser d'1 kHz, amb una resolució de

12 *bits*. Els registres obtinguts al llarg de l'experiment van ser emmagatzemats en suport digital per a la seva anàlisi posterior (fig. 2.5).

Polígraf GRASS[®], model 7 (Grass instruments CO., Quincy, Mass., USA), per a l'obtenció i processament dels senyals electrocardiogràfiques *in vivo*.

C) Programes informàtics:

- **Pacemap®**, utilitzat per a l'adquisició i registre dels senyals elèctrics i posteriors anàlisis. Aquest programa emmagatzema els registres en el disc dur de l'ordinador (fig. 2.6), sent l'extracció dels episodis requerits una tasca senzilla i ràpida.



Fig. 2.6. Programa **Pacemap®**, utilitzat per a l'adquisició i registre dels senyals elèctrics i posteriors anàlisis.

- **MedMap®**, desenvolupat sota entorn **MatLab®**, utilitzat

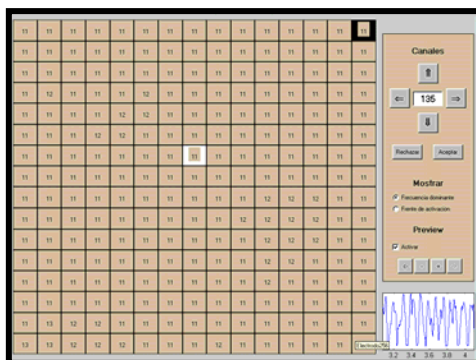


Fig. 2.7. Programa **MatLab®**, utilitzat fonamentalment per a la comprovació i validació dels mapes i espectres de freqüència dels senyals de FV.

fonamentalment per a la comprovació i validació dels mapes i espectres de freqüència dels senyals de FV. Mitjançant lleugeres modificacions i ampliacions d'aquest programa es van realitzar algunes correccions i millores. Se

li va dotar de la capacitat d'importar els arxius de senyals generats pel programa PaceMap®, es va automatitzar el càlcul de les freqüències dominants dels espectres i es va optimitzar el càlcul estadístic per matrius d'elèctrodes (fig. 2.7).

- **Biopac[®]**, utilitzat per a l'adquisició i registre dels senyals electrocardiogràfiques i posterior anàlisi. Aquest programa també emmagatzema els registres en el disc dur de l'ordinador.

- **SPSS[®]**, per a l'anàlisi estadística dels resultats obtinguts en relació a la refractarietat miocàrdica dels animals estudiats.

- **Microsoft office[®]**, que ha estat el nostre suport informàtic per a la present tesi tant en la seua elaboració, emmagatzemament i reproducció.

D) Sistema de perfusió del cor (fig. 2.8):

- Sistema de suport metabòlic tipus **Langendorff**.
- **Bomba peristàltica** (Cole-Parmer[®] Instrument co.).
- **Bomba circulant** de termostatació (Neslab[®] Instrument, inc).

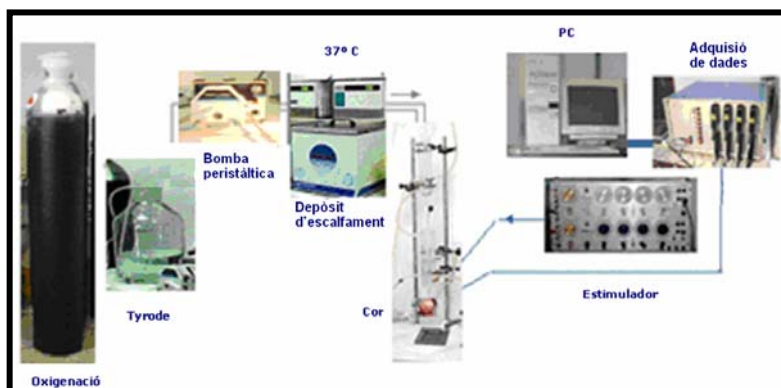


Fig. 2.8. Esquema d'una preparació de cor aïllat de conill, en la que s'indica la ubicació del líquid nutrici (Tyrode) en un recipient connectat a una bala de carbogen, amb bany per a termostatar el líquid nutrici, i bombes de perfusió, sistema de mesura de la pressió de perfusió, filtres, conducció de Tyrode i del líquid termostatzant (modificat de Tormos A, 2005).

2.2. Mètodes

2.2.1. Protocol d'entrenament dels animals

Només els conills del grup d'animals entrenats van ser sotmesos a un protocol d'entrenament en cinta rodant durant 6 setmanes, més una addicional d'aclimatació, el mateix temps que van romandre estabulats els conills del grup control. El protocol d'entrenament va consistir en 30 sessions, és a dir, 5 dies a la setmana durant les 6 setmanes. Cada sessió es va compondre de 6 sèries de carrera contínua sobre tapis rodant, en cada una de les quals l'animal va córrer a una velocitat de **0,33 m/s**, (20 m/min o 1,2 km/h) durant 4 minuts. L'interval de descans entre cada una de les 6 sèries va ser d'1 minut. Així, el temps d'entrenament total diari va ser de 30 minuts. Prèviament a la iniciació de les sessions d'entrenament, els conills van ser sotmesos a un període de 4 sessions de familiarització amb la cinta rodant.

La correcta realització de l'exercici sobre la cinta rodant va ser regularment supervisada per dos observadors. Els conills que una vegada iniciat el període d'entrenament no van córrer adequadament durant cinc sessions consecutives, van ser exclosos del present estudi. Finalitzat el protocol d'entrenament es va procedir a sacrificar els animals per a realitzar l'estudi electrofisiològic.

Els conills no entrenats (grup control) van romandre en les respectives gàbies durant un temps igual al total del temps necessari per a l'entrenament dels conills del grup entrenat, és a dir, sis setmanes, més la setmana que comporta la familiarització dels conills amb la cinta per al seu posterior entrenament.

Les condicions en què van romandre estabulats els conills també van ser controlades, sent el fotoperíode de llum artificial de 12 hores (12 hores de llum i 12 hores de foscor), la temperatura es va mantindre entre els 21 - 23° C i la humitat relativa del 31 %. Cada conill va estar en una gàbia individual de dimensions reglamentàries, i es va utilitzar borumballa d'anouer Lignocel UBK 1500/3000 per a mantindre en les condicions de neteja més adequades.

Es va alimentar tots els animals estudiats amb aigua i pinso (Harlan Teklad Global Rabbit Diet) *ad libitum* i es mostra còpia textual de la seua composició en la taula 2.1.

		AMINOÀCIDS	VITAMINES	MINERALS
Proteïnes	16'90%	A. aspàrtic	A	Fe
Greixos	3%	A. glutàmic	D ₃	Mg
Fibra	14'30%	Alanita	E	Zn
Proteïna de cendra	8%	Glicina	K3	Cu
Hidrats de C	56'7%	Treonina	B-1	CO
Midó	19'3%	Prolina	B-2	Na
Sucre	4'3 %	Serina	B-6	Cr
		Leucina	B-12	Ca
		Isoleucina	C	P
		Valina	A. pantotènic	K
		Fenilalanina	A.Fòl·lic	Cl
		Tirosina	biotina	I
		Metionina	colina	Mn
		Cisterna	retinol	Se
		Lisina	niacina	
		Histidina	inositol	
		Arginina	β-caroten	
		Triptòfan		

Taula 2.1. Composició del pinso Harlan Teklad Global Rabbit Diet .

2.2.2. Estudi electrofisiològic

2.2.2.1. Preparació experimental.

Després de l'heparinització (heparina 800 UI), i anestèsia intravenosa dels conills (ketamina 12,5 mg/kg), a través de la vena marginal de l'orella, es van sacrificar per mitjà de contusió cervical. Després d'una toracotomia central i una pericardiotomia, es va extraure el cor ràpidament, seccionant-lo pel seu pedicle vascular, i es va submergir en una solució freda de Tyrode (8° C), per a posterior manipulació. Després de seccionar l'artèria pulmonar i a continuació dissecar l'artèria aorta ascendent, aquesta es va seccionar també, i es va

connectar al sistema de Langendorff, on es va fixar per mitjà d'un fil de seda de 1-2 mm de diàmetre (fig. 2.9), perforant retrògradament al cor amb la solució de Tyrode a $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$, i que conté en concentració mM: NaCl 130, KCl 4,7, CaCl_2 2,2, MgCl_2 0,6, NaH_2PO_4 1,2, NaHCO_3 24,2 i glucosa 12. El pH es va mantenir a 7,4 (García Civera R *et al.*, 1987; pres de Such-Miquel, 2005). L'oxigenació i suport de pH de la solució de Tyrode es va efectuar amb carbogen (95 % O_2 i 5 % CO_2). La pressió de perfusió inicial es va fixar en 60 mmHg.

El sistema de perfusió de Langendorff, que hem mostrat amb anterioritat en la figura 2.8, permet l'arribada al cor de l'oxigen i els nutrients necessaris a través de l'aorta ascendent. Es tracta d'una perfusió retrògrada cap al sistema de vasos coronaris.

Una vegada ubicat el cor en el sistema, es van eliminar les restes dels altres teixits (pulmó, tràquea, etc.) i per mitjà d'una xicoteta secció en l'aurícula esquerra, es va procedir a la realització d'una xicoteta obertura en l'orelleta de l'aurícula esquerra per a poder tallar les cordes tendinoses de la vàlvula mitral, a fi de fer-la insuficient i permetre la fuga, si és el cas, de líquid per l'aurícula esquerra, evitant així possibles acumulacions de Tyrode en el ventricle esquerre, en el cas que la vàlvula aòrtica mostrara certa insuficiència.

El líquid de perfusió és impulsat des d'un depòsit exterior on s'oxigena fins a la part més elevada del sistema de Langendorff per mitjà d'una bomba peristàtica, previ pas per un filtre. Una vegada en el sistema el líquid va escalfant-s'hi progressivament fins a aconseguir una temperatura de 37° C.

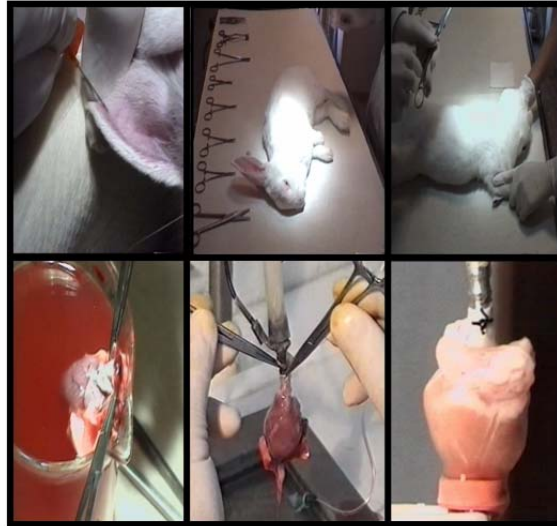


Fig. 2.9. Seqüència d'imatges de la preparació

Els elèctrodes es van disposar de la següent manera (fig. 2.10): es va ubicar un elèctrode bipolar, revestit de plata, per al registre de l'electrograma auricular i el registre ventricular es va realitzar per mitjà d'un elèctrode múltiple amb 256 elèctrodes unipolars d'acer

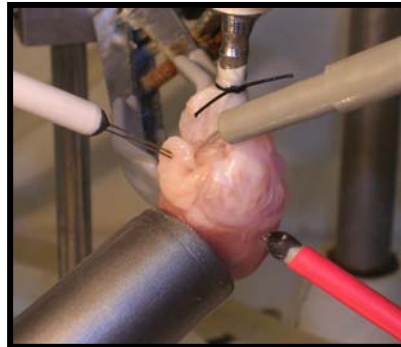


Fig. 2.10. Ubicació dels electrodes.

inoxidable col·locats en la superfície epicàrdica de la paret lateral del ventricle esquerre. L'elèctrode bipolar d'estimulació es va col·locar en principi en l'aurícula esquerra per a realitzar el test de l'extraestímul auricular i posteriorment es va ubicar en el ventricle esquerre per a la realització del test de l'extraestímul ventricular i inducció de la FV per mitjà de l'estimulació a freqüències creixents. L'elèctrode indiferent es va ubicar sobre l'aorta canulada. La gravació dels registres va ser obtinguda amb un sistema de cartografia de l'activitat elèctrica cardíaca (Maptech[®]). Els estímuls elèctrics es van aplicar amb un estimulador Grass S88[®] (Grass Instruments[®], Inc., Quincy, M.A., U.S.A.) fixats a una unitat d'aïllament d'estímuls (SIU).

2.2.2.2. Definició i determinació dels paràmetres a investigar

A) Definició dels paràmetres:

- **Paràmetres electrofisiològics utilitzats per a la valoració de l'automatisme sinusal:**

- **Longitud del cicle sinusal:** és el temps, habitualment expressat en milisegons, que existeix entre una despolarització auricular o ventricular espontània i la següent. Com és conegut, aquest paràmetre està en funció inversa amb la freqüència cardíaca.

- **Paràmetres electrofisiològics utilitzats per a la valoració de la conducció auriculoventricular i ventricular:**

- **Temps de conducció auriculoventricular (interval A-V):** és el temps, expressat en mil·lisegons, que existeix entre una despolarització auricular i la despolarització ventricular que la segueix.

- La **velocitat de conducció** és la distància, expressada en centímetres, recorreguda per l'ona de despolarització al llarg del miocardi ventricular durant un segon.

$$VC = \frac{d_{ab}}{t_r}$$

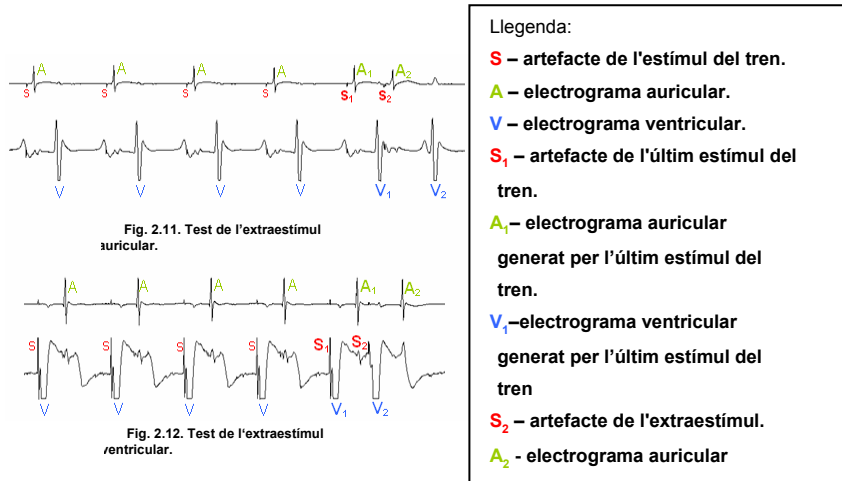
- La **longitud d'ona** és el producte del període refractari efectiu ventricular per la velocitat de conducció. Es defineix com la distància recorreguda per l'ona de despolarització durant la duració del seu període refractari.

$$LO = PREV \cdot VC$$

- **Paràmetres electrofisiològics utilitzats per a la valoració de la refractarietat miocàrdica:**

Abans de la definició dels diferents paràmetres electrofisiològics relatius a la refractarietat miocàrdica utilitzats

en el nostre estudi, il·lustrem en les següents figures (2.11 i 2.12) i de forma genèrica, els tests de l'extraestímul auricular i ventricular respectivament.



- **Període refractari efectiu auricular (PREA):** és l'interval més llarg S_1 - S_2 en què l'extraestímul S_2 no aconsegueix despolaritzar l'aurícula (S_1 és l'artefacte de l'últim estímul del tren i S_2 és l'artefacte de l'extraestímul).

- **Període refractari funcional auricular (PRFA):** és l'interval A_1 - A_2 més curt propagat de dos estímuls sobre aurícula amb el test de l'extraestímul auricular (A_1 és l'electrograma generat per l'últim del tren fix d'estimulació i A_2 l'electrograma auricular generat per l'extraestímul).

- **Període refractari efectiu del sistema de conducció auriculoventricular (PRESCAV):** és l'interval A_1 - A_2 més llarg,

sense el V_2 corresponent (electrograma ventricular generat per A_2).

- **Període refractari funcional del sistema de conducció auriculoventricular (PRFSCAV):** és el mínim interval d'adaptament entre l'electrograma ventricular produït per l'últim estímul del tren base auricular i el que està produït per l'extraestímul (el mínim interval V_1-V_2).

- **Període refractari efectiu del sistema de conducció ventriculoauricular (PRESCVA):** és l'interval V_1-V_2 més llarg, sense el A_2 corresponent (electrograma auricular generat pel V_2).

- **Període refractari funcional del sistema de conducció ventriculoauricular (PRFSCVA):** és el mínim interval d'acoblament entre l'electrograma auricular produït per l'últim estímul del tren base ventricular i el que està produït per l'extraestímul (el mínim interval A_1-A_2).

- **Període refractari efectiu ventricular (PREV):** és el màxim interval d'acoblament de l'extraestímul ventricular (S_1-S_2) sense captura ventricular (S_2 sense V_2).

- **Període refractari funcional ventricular (PRFV):** és el mínim interval entre l'electrograma ventricular produït per l'últim estímul del tren base ventricular i el desencadenat amb l'extraestímul (mínim interval V_1-V_2).

- **Paràmetres electrofisiològics utilitzat per a la valoració de la freqüència dominant de la FV:**

Entenem per freqüència dominant de la FV, la freqüència amb què la distribució espectral de potència del senyal presenta la màxima amplitud (Ropella, 2001; citat per Tormos, 2005). Aquest concepte s'il·lustra en la figura 2.17. Així en la present tesi estudiarem els paràmetres següents:

- **Freqüència dominant màxima (FrDMàx):** és la freqüència màxima de l'espectre registrat pel multielèctrode en un temps determinat de la FV.

- **Freqüència dominant mínima (FrDMín):** és la freqüència mínima de l'espectre registrat pel multielèctrode en un temps determinat de la FV.

- **Freqüència dominant mitja (FrDM):** és la mitjana de les freqüències dominants registrades pel multielèctrode en un temps determinat de la FV.

- **Paràmetres utilitzats per al control i tipificació de l'entrenament:**

- Freqüència cardíaca en repòs, *in vivo*.
- Concentracions plasmàtiques de lactat.
- Expressió de l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS).
- Expressió d'HSP60 (proteïna de xoc tèrmic).

B) Determinació dels paràmetres:

- **Determinació dels paràmetres electrofisiològics per a la valoració de l'automatisme sinusal:**

Analitzem la longitud del cicle sinusal bàsic mitjançant la mesura de l'**interval V-V**, mesurant el temps entre dos despolaritzacions espontànies ventriculars del registre basal. Hem preferit usar l'interval V-V per a la determinació de la longitud del cicle sinusal, ja que les despolaritzacions ventriculars són de major voltatge que les auriculars i que el temps entre dos despolaritzacions auriculars espontànies consecutives i entre les seues respectives despolaritzacions ventriculars, és idèntic (fig. 2.13).



Fig. 2.13. Imatge de la mesura del V-V.

- **Determinació dels paràmetres electrofisiològics per a la valoració de la conducció auriculoventricular:**

Analitzem l'interval **A-V**, mesurant el temps entre un auriculograma i el ventriculograma que li segueix d'un registre sinusal bàsic (fig. 2.14).

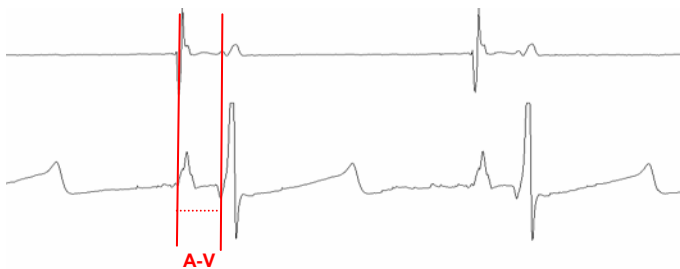


Fig. 2.14. Imatge de la mesura de l'A-V

Analitzem la **velocitat de conducció (VC) ventricular**.

La determinació de paràmetres en què és necessari l'ús d'estimulació elèctrica requereix de l'explicació d'alguns

aspectes relacionats amb la mateixa i que abordem a continuació:

Tant els estímuls elèctrics dels trens com els extraestímuls van ser d'una intensitat doble a la del **llindar diastòlic**. Per a la determinació de tal llindar es va utilitzar l'estimulador Grass, amb una freqüència constant de 4 pulsos per segon i una duració de l'estímul, també constant, de 2 ms. Des d'una intensitat en què tots els estímuls emesos per l'estimulador eren capturats i per tant s'evidenciava una resposta ventricular mantinguda a aquesta estimulació (40mA), dismi-nuïem de forma progressiva la intensitat dels estímuls, fins que el ventricle deixava de respondre (12-25 mA). En eixe moment lentament augmentàvem la intensitat dels estímuls i en el moment en què el cor responia novament i de forma mantinguda a l'estimulació, determinem haver aconseguit el llindar diastòlic, és a dir, **la mínima intensitat d'estímul capaç de produir una resposta excitatoria**. Una vegada calculat el llindar diastòlic, doblem el seu valor per a la realització dels test de l'extraestímul que consisteixen a estimular al miocardi (auricular o ventricular) per mitjà de trens de 10 estímuls, seguits d'un extraestímul. L'extraestímul es va acostant a intervals de 5 ms a l'últim estímul del tren, fins que no s'observa resposta elèctrica del teixit miocàrdic a l'extraestímul.

Posteriorment es determina la VC en el V_1 - V_2 de l'últim tren d'estimulació l'extraestímul del qual va produir resposta ventricular. En aquest tren, establim una finestra fixa que comprenia la despolarització ventricular produïda per l'extraestímul (EE), i es va procedir al marcat semiautomàtic de la mateixa. El programa utilitzat, *Pacemap*[®], va produir una codificació en colors dels temps resultants, obtenint un mapa d'activació fix (fig. 2.15) de la propagació de l'impuls pel miocardi ventricular podent així construir les isòcrones del procés d'activació ventricular produït.

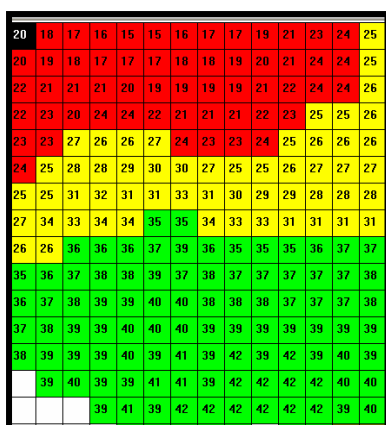


Fig. 2.15. Mapa d'activació.

En aquests mapes, s'ha calculat la VC, dividint la distància que separa a dos elèctrodes per la diferència de temps en la detecció de l'activació elèctrica ventricular per eixos mateixos elèctrodes, i situats en una direcció perpendicular a les isòcrones. Com els fronts d'ona poden viatjar de manera no paral·lela a la superfície

epicàrdica, la velocitat de conducció real poguera ser més lenta que el valor mesurat. Aquesta possible errada la vam reduir utilitzant només aquells mapes que l'entrada i l'eixida del front d'ona es van identificar en els extrems dels mapes d'activació.

- Analitzem, finalment, la **longitud d'ona del procés d'activació ventricular**, que com prèviament hem indicat en l'apartat de definicions, és el producte del període refractari efectiu ventricular per la velocitat de conducció.

- **Determinació dels paràmetres electrofisiològics per a la valoració de la refractarietat miocàrdica:**

Per a la determinació dels paràmetres electrofisiològics relacionats amb la refractarietat miocàrdica hem utilitzat el test de l'extraestímul a diferents longituds de cicle d'estimulació. Aquestes longituds de cicle d'estimulació dels diferents trens van ser d'un 10% inferior a la longitud del cicle sinusal bàsic, de 250, de 200 i de 150 ms per a cadascuna de les determinacions de refractarietat miocàrdica estudiada. A continuació descrivim el procés seguit per a la determinació d'aquestes.

- **Refractarietat auricular:** es va determinar per mitjà del test de l'extraestímul auricular, que es realitza de forma idèntica al test de l'extraestímul ventricular, exceptuant que l'elèctrode d'estimulació va ser ubicat en el miocardi auricular. El programa utilitzat, *Pacemap*[®], ens va permetre mesurar el temps en milisegons dels períodes refractaris efectiu i funcional de l'aurícula, com es va definir en l'apartat anterior.

- **Refractarietat del sistema de conducció auriculoventricular:** es va determinar també mitjançant el test de l'extraestímul auricular. Mesurem amb el programa *Pacemap*[®] el PRESCAV és a dir, l'interval A_1-A_2 sense V_2 i el PRFSCAV com l'interval V_1-V_2 més curt que no siga l'últim.

- **Refractarietat del sistema de conducció ventriculoauricular:** es va determinar a través de la realització del test de l'extraestímul ventricular. Mesurant amb el *Pacemap*[®] el temps en ms de l'interval V_1-V_2 sense A_2 per al PRESCVA i l'interval A_1-A_2 més curt que no siga l'últim per al PRFSCVA.

- **Refractarietat ventricular:** es va determinar mitjançant el test de l'extraestímul ventricular i es va mesurar amb el programa *Pacemap*[®] el temps en milisegons entre el màxim interval S_1-S_2 sense V_2 per al PREV (fig. 2.15) i el mínim interval V_1-V_2 per al PRFV (fig. 2.16).

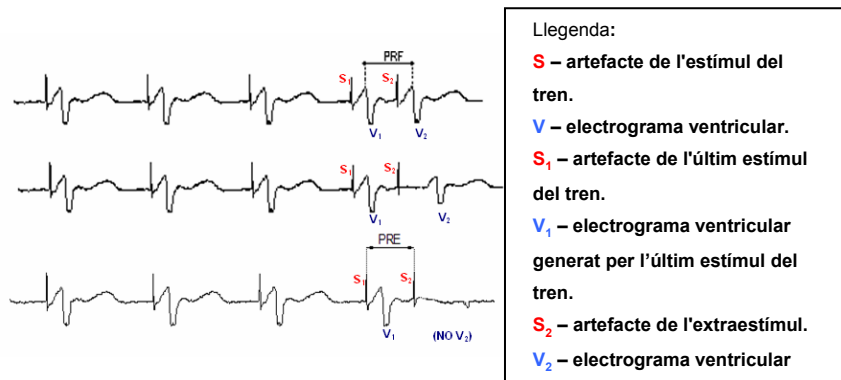


Fig. 2.16. Període refractari funcional ventricular (PRFV).

- **Determinació dels paràmetres electrofisiològics per a la valoració de la freqüència de FV:**

- Freqüència dominant màxima, mínima i mitjana:**

Es va induir la FV del miocardi estimulant el ventricle esquerre a freqüències creixents a partir de 4 Hz, amb un increment de 0,1 Hz cada 3 s fins a desencadenar la FV mantenint la perfusió coronària. La intensitat d'estimulació va ser un 40% superior al doble del llindar diastòlic. L'estimulació va ser interrompuda en el moment en què es va instaurar la FV.

Posteriorment, analitzarem la freqüència dominant (FrD) mitjana, màxima i mínima dels senyals fibril·latoris registrats amb tots els elèctrodes unipolars localitzats en el ventricle per mitjà del Mètode de *Welch*, que es basa en els estudis clàssics de Fourier sobre els harmònics constituents d'una ona composta (fig. 2.17).

L'anàlisi espectral de la FV es va realitzar en el minut cinc després de la inducció de la FV. Aquesta anàlisi es va efectuar utilitzant blocs de dades de 2048 punts, aplicant la finestra d'Hamming. Es va obtenir per a cada bloc la freqüència dominant (FrD), és a dir, la freqüència corresponent amb l'espectre màxim, i l'energia continguda en el segment del periodograma corresponent a $FrD \pm 1$ Hz. La densitat de l'espectre de potència (DEP) es calcula amb el quadrat de l'amplitud del senyal, expressat en unitats arbitràries

El processament de dades es va efectuar mitjançant el programari MatLab® en una plataforma Hewlett-Packard 712/80 (Hewlett-Packard CO., Pal Alt, CA, USA).

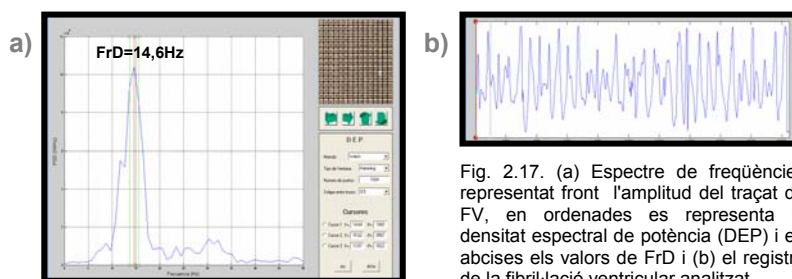


Fig. 2.17. (a) Espectre de freqüències representat front l'amplitud del traçat de FV, en ordenades es representa la densitat espectral de potència (DEP) i en abscises els valors de FrD i (b) el registre de la fibril·lació ventricular analitzat.

- **Determinació dels paràmetres utilitzats per al control i tipificació de l'entrenament:**

D) Freqüència cardíaca en repòs, *in vivo*:

Per a l'estudi de freqüència cardíaca en repòs *in vivo*, es va sotmetre als dos grups d'animals tant entrenats com controlats a un registre electrocardiogràfic. Es van realitzar dos registres electrocardiogràfics. El primer que ens va servir com a valor basal, es va dur a terme en la setmana anterior al començament del protocol d'entrenament, és a dir, en el període establert per a la familiarització del conill amb la cinta rodant. El segon registre electrocardiogràfic es va realitzar en la sexta i última setmana d'entrenament, i va constituir el valor final d'aquest paràmetre.

Després de la introducció dels conills en l'immobilitzador i col·locació dels elèctrodes, el senyal elèctric es va captar, es va registrar i es va emmagatzemar amb el polígraf GRASS® i el Biopac® per a la seua anàlisi posterior.

- Concentració plasmàtica de lactat:

Durant el temps que va durar el protocol d'entrenament es va sotmetre als conills entrenats a diferents controls sanguinis per a la determinació de la concentració de lactat plasmàtic, a fi d'analitzar l'evolució del mateix durant les sessions d'entrenament i així poder determinar el tipus d'entrenament.

Amb aquest objectiu es va utilitzar l'equip de mesurament Accutrend® Lactate i les seves tires reactives per a les determinacions de la concentració de lactat d'una mostra de sang venosa, que es va extraure per punció de la vena marginal de l'orella del conill.

A l'aplicar la sang en la tira reactiva es desenvolupa una reacció química amb modificació cromàtica de la zona reactiva que és registrada per l'equip de mesura i se li assigna un resultat comparant-la amb el valor de la tira control o codi, introduïda prèviament en l'equip.

El lactat és determinat a través de la reacció cromàtica d'un mediador de L-lactat: oxigen2-oxidoreductasa (descarboxilant) i

mesurat per fotometria de reflexió a una longitud d'ona de 657 nm (fig. 2.18):

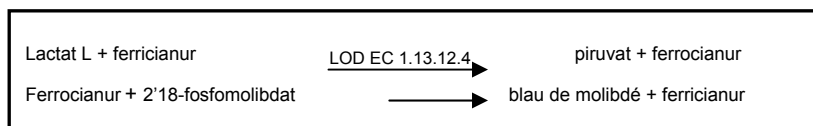


Fig. 2.18. Mediadors de la reacció cromàtica per a la determinació de la concentració de lactat amb l'equip de mesura Accutrend® Lactate.

L'extracció de sang de la vena marginal de l'orella es va realitzar de forma estandarditzada: després d'introduir als animals en l'immobilitzador, es va procedir a desinfectar la cara externa d'una de les orelles del conill amb una solució de povidona iodada al 10% amb una gasa estèril, i es va procedir a la punció de la vena marginal de l'orella del conill amb una microllanceta (0,8 x 40mm) i es va esperar uns segons fins que la primera gota de sang contactara amb la zona reactiva de la tira de mesura, finalment s'introdueix la tira en l'equip de mesura, el qual passats uns segons mostrava el resultat de la concentració de lactat plasmàtic en el marcador digital.

Es van realitzar 4 determinacions per sessió d'entrenament: una abans de començar la sessió de carrera contínua, que denominarem *basal* o *temps 0*; una, transcorreguda la primera sèrie de la sessió d'entrenament, a la que anomenarem *temps 1*; una, transcorreguda la tercera sèrie d'entrenament, que serà la *temps 2* i finalment, després de la sexta sèrie d'entrenament o *temps 3* (fig. 2.19).

Els controls de lactat es van realitzar en la primera sessió d'entrenament de la primera setmana del protocol, en la primera sessió de la quarta setmana del protocol d'entrenament i finalment en l'última sessió de la sexta setmana d'entrenament, amb la qual cosa vam poder conèixer els nivells de lactat en sang abans, durant i al final del procés (fig. 2.19).

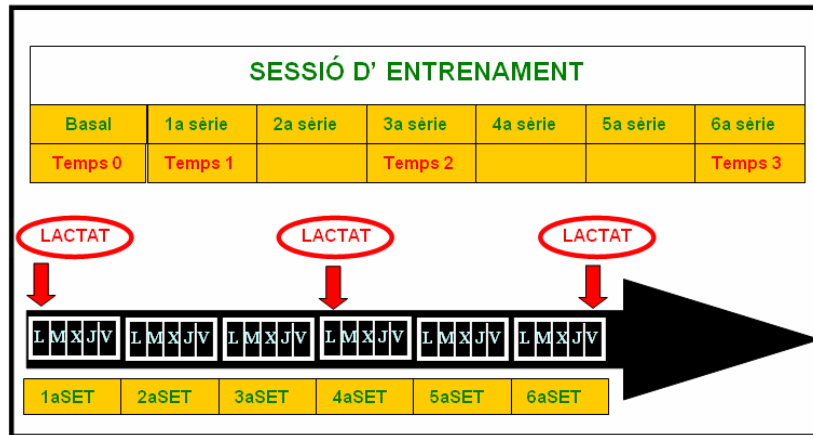


Fig. 2.19. Proves de lactat.

- Expressió de l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS) i una proteïna de xoc tèrmic (HSP60):

A) Extracció de proteïnes citoplasmàtiques a partir de teixit muscular.

- **Fonament:**

Per a dur a terme la valoració de l'expressió d'iNOS i HSP60 transferint aquestes proteïnes des dels gels a membranes (*Western Blotting*) és necessària l'obtenció d'extractes de proteïnes citoplasmàtiques. Vam obtenir sis biòpsies de ventricle esquerre de conill, tres d'elles de conills del grup entrenat i tres del grup control. Aquestes es van obtenir immediatament després de finalitzar el protocol experimental mitjançant la tècnica del *freeze-clamping*. Aquesta tècnica consisteix en la compressió de la mostra amb unes pinces que prèviament han estat submergides en nitrogen líquid (-196° C). La mostra se submergeix en nitrogen líquid uns segons fins que es congela, preservant així totes les seves característiques bioquímiques. A continuació, les mostres es van emmagatzemar a -85° C fins al seu posterior anàlisi bioquímica.

- **Protocol:**

Es parteix de fragments de múscul cardíac d'entre 100 i 150 mg que són en primer lloc llavats en fosfat tampó salí.

Després del llavat es tallen en xicotets trossos en tampó de lisi fred (1 ml per cada 100 mg de teixit). El tampó consta de: 1% Nonidet-P40; 50 mM NaCl; Tris 10 mM pH 7,5; 5 mM àcid

etilendiaminotetraacètic; Sucrosa 0,25 M; Pirofosfat Sòdic 30 mM; 50 mM NaF; 1 mM _{DL}-ditiotreitòl; 1 mM Fenil metil sulfonil fluoride; 3 mM Benzamidina; 10 µm Leupeptina; 10 µg/ml Aprotinina; 5 µm Pepstatina A).

La mostra es transferida a un homogeneïtzador tipus Dounce de vidre (Afora S.A., Espanya) introduït en gel.

La suspensió se sotmet a deu passes d'homogeneïtzació amb l'èmbol.

El producte inicial es passa a tubs de microcentrífuga i se centrífuga durant 15 minuts a 12.000 xg a 4° C.

El sobrenadant que conté els extractes proteics citoplasmàtics és emmagatzemat a -80° C fins a la seua valoració i utilització.

- **Quantificació:**

En els extractes citoplasmàtics els valors de concentració de proteïnes van ser obtinguts pel mètode de Bradford. Per a això es preparen dilucions 1/400 dels extractes per a un volum final de 800 µl d' aigua. A aquest volum se li afegeixen 200 µl de

colorant de Bradford (BIORAD, USA). Els valors d'absorbància, a una longitud d'ona de 595, són interpolats en una corba patró prèviament obtinguda mitjançant dilució seriada de BSA de concentració inicial coneguda. Amb això podem conèixer el valor de concentració en proteïnes de la mostra original.

B) Electroforesi en Gels de Poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) i posterior *Western Blotting*.

Per a l'estudi de l'expressió de la iNOS i l'HSP60 miocàrdica es va realitzar una electroforesi en Gels de Poliacrilamida-SDS i posterior *Western-Blotting* (fig. 2.20).

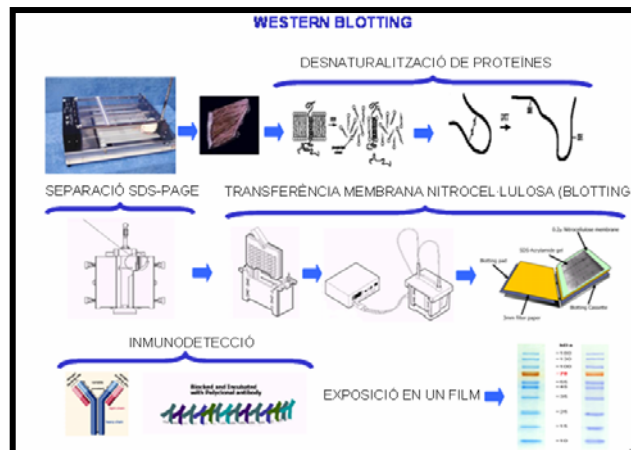


Fig. 2.20. Esquema de la tècnica del *Western-Blotting* (Modificat de Doménech , 2006).

- **Fonament:**

L'electroforesi és un transport sota l'acció d'un camp elèctric. L'electroforesi en gels amb una matriu de poliacrilamida, normalment denominada electroforesi en poliacrilamida, s'utilitzen majoritàriament per a la separació de proteïnes. Concretament es va utilitzar el PAGE en condicions desnaturalitzants. En presència d'alguns compostos químics les proteïnes perden la seua estructura nativa. Aquests composts, agents desnaturalitzants, produeixen el desplegament de la proteïna que apareix així sense l'organització tridimensional característica de la seua funció biològica. La combinació d'un detergent desnaturalitzant (SDS) i un agent reductor (β -mercaptoetanol) és la que es va utilitzar.

Els complexos SDS-proteïna se separen estrictament segons el seu grandària molecular i, així, és possible estimar la seua massa molecular. En presència d'una concentració de SDS superior a 8 mM es produeix la unió d'una molècula de SDS per cada 2 aminoàcids. Les càrregues pròpies de les proteïnes queden així emmascarades o anul·lades. Com cada molècula de SDS proporciona una càrrega negativa (del grup SO_4^-), els complexos proteïna/SDS estan carregats negativament de forma uniforme. La separació, per tant, depén d'un paràmetre fisicoquímic, la massa molecular, que es pot calcular.

- **Condicions del gel i transferència:**

Per a detectar l'expressió d'iNOS i HSP60 es van carregar 50-60 µg de proteïna citoplasmàtica en gels discontinus al 12% d'Acilamida (29:1 Acilamida:Bisacilamida) amb un 0,1% de SDS, sobre els quals es va aplicar un camp elèctric de voltatge constant de 100 Volts durant almenys 2 hores en tampó tris-glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Una vegada finalitzat el desplaçament electroforètic el gel és transferit (*Western Blotting*) a una membrana de Nitrocel·lulosa (Schelider & Schuel, USA), mitjançant l'electrotransferència en condicions humides per mitjà del sistema Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, USA).

El procés es desenvolupa durant 2 hores, a una temperatura de 4° C, una intensitat constant de 300 mA, en tampó de transferència (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

- **Visualització:**

- Després de la transferència les membranes s'incuben 60 minuts a temperatura ambient en tampó de bloqueig: 5% p/v de

llet desnatada en pols, 0,1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).

- Realitzem 3 llavats de 5 minuts amb 15 ml de TBS-T.

- Les membranes s'incuben durant tota la nit a 4° C amb agitació orbital en tampó d'anticòs (5% BSA, 0,1 % Tween-20 en 1XTBS) i amb les corresponents dilucions d'anticossos primaris (taula 2.2).

- Realitzem 3 llavats de 5 minuts amb 15 ml de TBS-T.

- Les membranes són incubades durant 60 minuts amb l'anticòs secundari. L'anticòs es dissol en tampó de bloqueig.

- Realitzem 3 llavats de 5 minuts amb 15 ml de TBS-T.

- La membrana s'incuba durant 1 minut amb reactiu ECL (Amersham Pharmacia, USA) i immediatament s'analitzen amb el Sistema d'Anàlisi d'Imatges, FUJIFILM®, model LES-1000 plus.

Anticòs	PM (KDa)	Dilució
Anti-Inos	130	1:2000
Anti-HSP	68	1:10000
Anti α -actina	42	1:500

Taula 2.2. Relació dels anticossos utilitzats en la tècnica del *Western-Blotting*.

- **Quantificació dels resultats:**

Les imatges obtingudes van ser densitometrades utilitzant el programari Image Gauge V 3.46 (Fujifilm). Els valors de les proteïnes estudiades es van expressar en funció dels valors d'expressió d' α -actina en els extractes citosòlics musculars.

2.2.2.3. Grups d'estudi

Es va dividir als animals en dos grups: control, compost per un total de 12 conills no entrenats; i grup entrenat, compost per un total de 15 animals.

2.2.2.4. Protocol experimental

Després d'ubicar el cor en el sistema de Langendorff, situar els elèctrodes corresponents i transcorreguts 20 minuts d'estabilització de la preparació experimental, es va procedir a la realització del següent protocol (fig. 2.21):

A) Mesura de flux coronari.

B) Registre electrogràfic basal, per a la determinació de l'automatisme sinusal i la conducció auriculoventricular.

C) Test de l'extraestímul auricular amb diferents cicles d'estimulació: al 10% de la freqüència basal, a 250 ms, a 200 ms i a 150 ms; per a l'estudi de la refractarietat auricular i de la refractarietat del sistema de conducció auriculoventricular.

D) Registre electrogràfic per a la determinació de l'automatisme sinusal novament.

E) Test de l'extraestímul ventricular amb diferents cicles d'estimulació: al 10% de la freqüència basal, a 250 ms, a 200 ms i a 150 ms; per a l'estudi de la refractarietat ventricular, del sistema de conducció retrògrad i de la velocitat de conducció ventricular.

F) Inducció de la FV amb freqüències creixents per a l'estudi de la freqüència dominant de la FV en el cinquè minut de registre de la mateixa.

G) Mesura del pes dels cors.

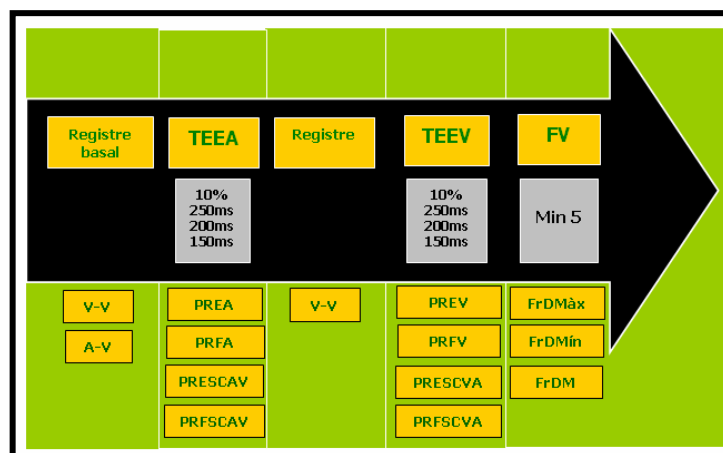


Fig. 2.21. Protocol experimental.

2.3. Anàlisi estadística

Per a la comparació, entre el grup de conills entrenats i el grup de conills control, dels diferents paràmetres estudiats en la present tesi hem utilitzat diversos tests estadístics; així, per a l'estudi de l'automatisme sinusal, la conducció ventricular, la conducció auriculoventricular, la longitud d'ona, la freqüència dominant de la fibril·lació ventricular, l'expressió de la iNOS i l'HSP es va utilitzar el test de la *t de Student* per a mostres no aparellades, i per a l'anàlisi i els valors de la refractarietat auricular, ventricular i del sistema de conducció tant auriculoventricular com ventriculoauricular es va utilitzar el test Anova i posteriorment per confirmar la seua significació, un test de DMS. Finalment, per l'anàlisi dels resultats de lactat en sang es va utilitzar els tests Anova i Scheffe. S'han considerat els valors de $p < 0,05$ com significatius.

2.4. Legislació

Tots els estudis van ser realitzats d'acord amb el que estableix el Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres fins científics (B.O.E. 21 d'octubre de 2005).

CAPÍTOL 3

Resultats

3. RESULTATS

Els resultats del present estudi, seran expressats com a mitjana aritmètica i error estàndard en les diferents figures i com a mitjana aritmètica amb la seua desviació estàndard en les taules corresponents (annex). En la descripció dels resultats en el text, hem preferit expressar només les diferències percentuals de les mitjanes entre els dos grups de conills utilitzats en l'estudi. Al respecte, només s'ha fet al·lusió a aquelles diferències entre mitges la anàlisi estadística de les quals va mostrar una significació mínima ($p < 0,05$) per a ser considerats com significatius.

Els tests estadístics aplicats per a l'anàlisi dels resultats han sigut enumerats en el capítol anterior.

3.1. Automatisme

L'interval **V-V** dels electrogrames obtinguts dels cors de conills sotmesos al protocol d'entrenament, va ser un 16,8 % major ($p < 0,05$) que l'obtingut en els cors de conills controls (fig. 3.1 i taula 3.1 en annex). És a dir, la freqüència cardíaca mitjana dels cors corresponents al grup de conills entrenats va ser menor que la mostrada pel grup no entrenat (187,5 *versus* 219 ppm respectivament).

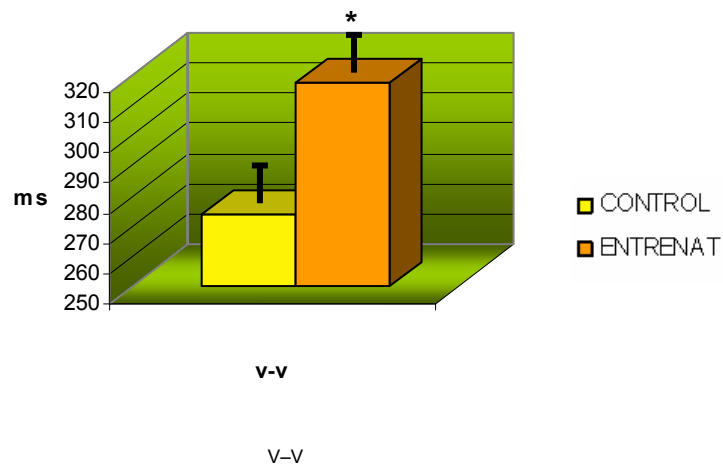


Fig 3.1. Efecte de l'entrenament sobre l'interval V-V. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

3.2. Conducció

A) Conducció auriculoventricular

L'interval A-V dels electrogrames dels cors de conills entrenats va ser un 13,1 % major ($p < 0,05$) que el dels cors de conills controls (fig. 3.2. i taula 3.1. en annex). Això és indicatiu que l'entrenament, almenys en el nostre model experimental, alenteix la conducció auriculoventricular.

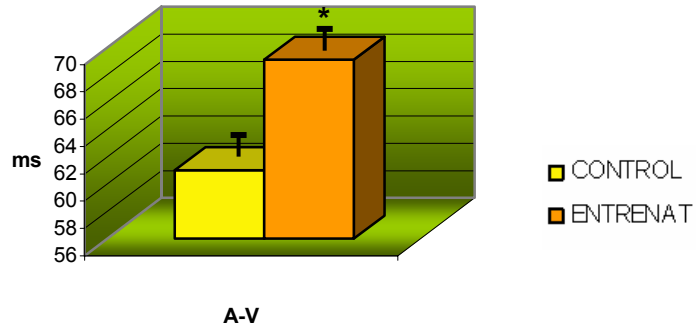


Fig. 3.2. Efecte de l'entrenament sobre l'interval A-V. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

B) Conducció ventricular

La velocitat de conducció de l'impuls elèctric en el miocardi ventricular no es va modificar al comparar els valors obtinguts en els electrogramas dels cors de conills entrenats al compararlos amb els obtinguts en els controls (fig. 3.3. i taula 3.2. en annex).

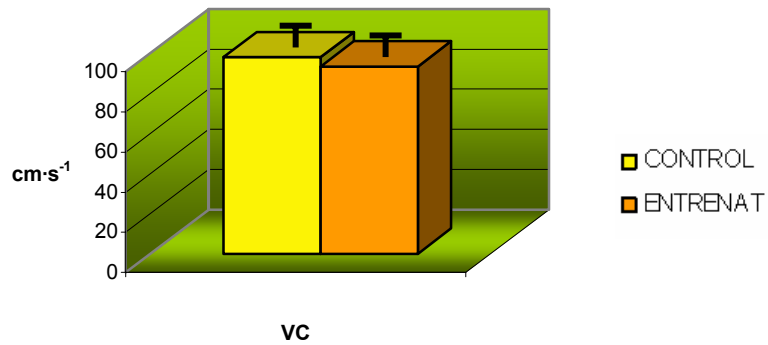


Fig. 3.3. Efecte de l'entrenament sobre la velocitat de conducció. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

C) La longitud d'ona

Com ja es va explicar en el capítol de *Material i Mètodes* la longitud d'ona del procés d'activació miocàrdica ventricular es defineix com el producte del valor mitjà de la velocitat de conducció de l'estímul elèctric pel valor mitjà del període refractari efectiu ventricular. Per açò, encara que com acabem d'exposar la velocitat de conducció no es va modificar per l'entrenament, la longitud d'ona del procés d'activació sí que va augmentar pel fet que ho va fer el període refractari ventricular (els resultats d'aquest es detallen posteriorment en l'apartat corresponent).

Així, la longitud d'ona del procés d'activació va ser un 9% major ($p < 0,05$) en els cors de conills entrenats *versus* els controls (fig. 3.4. i taula 3.2. en annex).

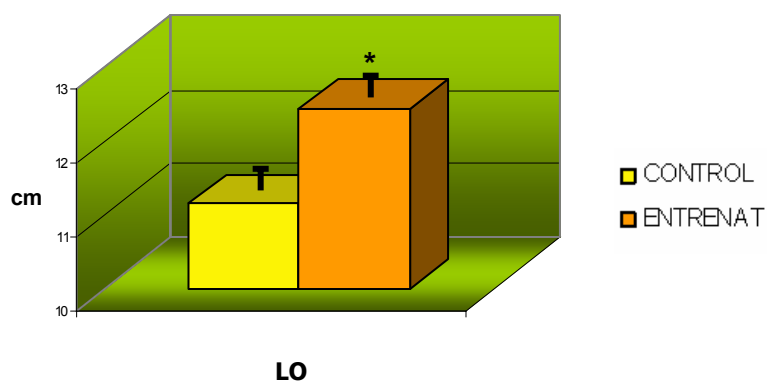


Fig. 3.4. Efecte de l'entrenament sobre la longitud d'ona. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

3.3. Refractarietat

A) Refractarietat auricular

Respecte al període refractari auricular no va haver-hi diferències estadísticament significatives entre els dos grups estudiats. Ni en el període refractari efectiu, ni en el funcional. Encara que va haver-hi una tendència clara a l'augment en ambdós períodes amb els quatre trens d'estimulació (fig. 3.5. i 3.6.; i taula 3.3. i 3.4. en annex).

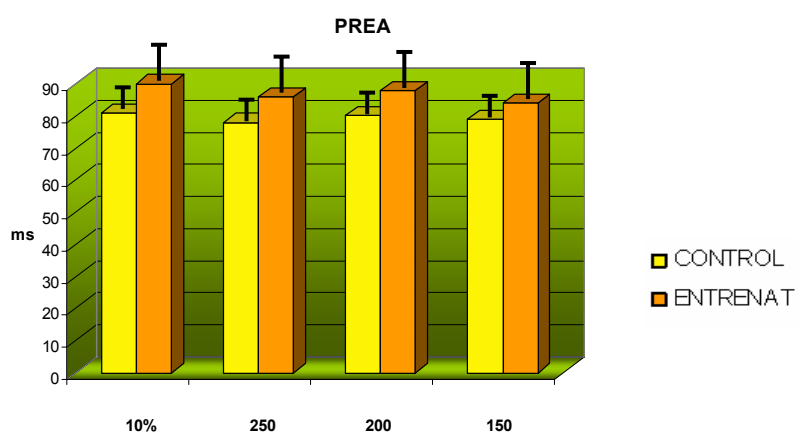


Fig. 3.5. Efecte de l'entrenament sobre el PREA. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

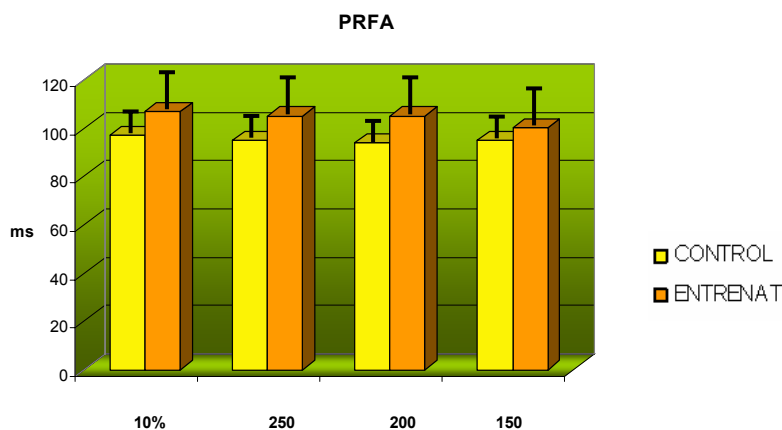


Fig. 3.6. Efecte de l'entrenament sobre el PRFA. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

B) Refractarietat del sistema de conducció auriculoventricular

Respecte al període refractari del sistema de conducció auriculoventricular dels cors d'animals estudiats no es van trobar diferències estadísticament significatives en els períodes refractaris efectius, al comparar els valors dels conills entrenats *versus* els valors dels cors dels conills control. Pel fet que durant la realització del test de l'extraestímul auricular es va aconseguir abans el període refractari efectiu auricular que el del sistema de conducció AV, no es va poder determinar el valor d'aquest paràmetre pels trens del 10% inferior que el cicle sinusal bàsic i el tren d'estimulació de 250 ms (fig 3.7. i taula 3.5. en annex).

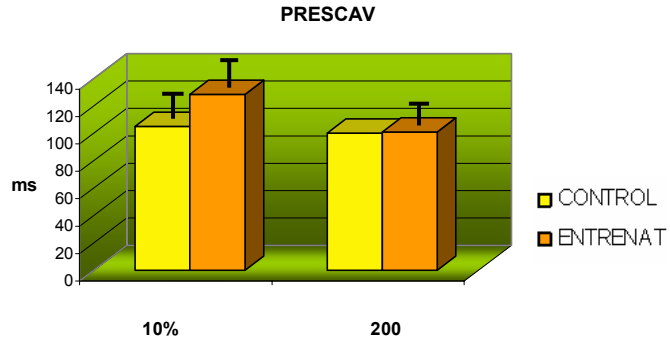


Fig. 3.7. Efecte de l'entrenament sobre el PRESCAV. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

No obstant, el període refractari funcional del sistema de conducció auriculoventricular va ser significativament major en els cors d'animals entrenats, al comparar-ho amb els controls. Així, hi ha un augment del 27,1% en el PRFSCAV del grup entrenat *versus* grup control quan el tren d'estimulació és d'un 10% menor del cicle sinusal bàsic, un va augmentar del 4,9 % quan estimulem a 250 ms, un augment del 14,5 % quan estimulem a 200 ms, i un augment del 8,7 % quan estimulem a 150 ms (fig. 3.8. i taula 3.6. en annex).

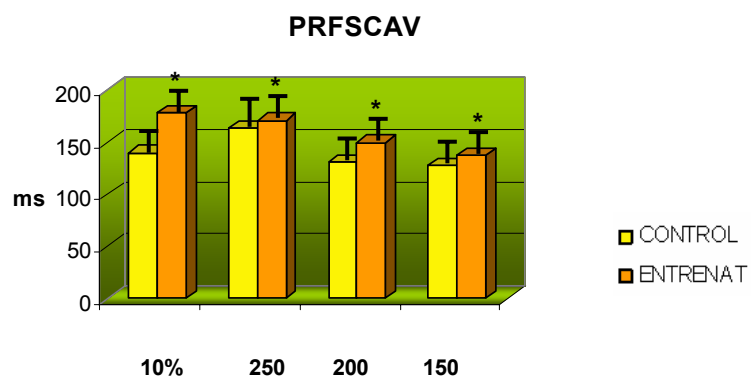


Fig. 3.8. Efecte de l'entrenament sobre el PRFSCAV. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

C) Refractarietat del sistema de conducció auriculoventricular retrògrad

El període refractari efectiu del sistema de conducció ventriculoauricular dels cors d'animals entrenats no es va modificar significativament en relació amb el del grup de conills control potser a causa d'un baix nombre de valors obtinguts atés que en la major part dels casos, durant la realització del test de l'extraestímul ventricular es va aconseguir abans el període refractari efectiu ventricular, amb la qual cosa no es va poder determinar el valor de tal paràmetre per al sistema de conducció VA (fig. 3.9 i taula 3.7. en annex).

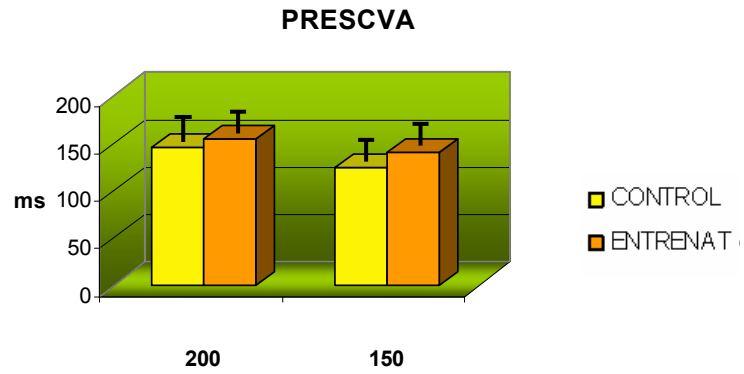


Fig. 3.9. Efecte de l'entrenament sobre el PRESCVA. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

Respecte al període refractari funcional del sistema de conducció ventriculoauricular tampoc va haver-hi diferències entre l'obtingut en els cors del grup de conills entrenats *versus* els del grup de conills control (fig. 3.10. i taula 3.8. en annex).

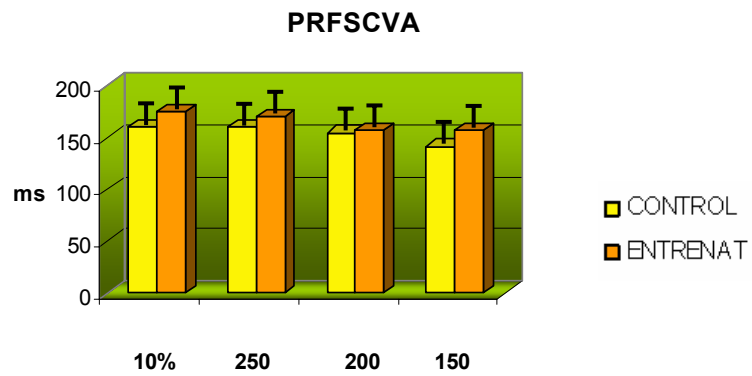


Fig. 3.10. Efecte de l'entrenament sobre el PRFSCVA. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

D) Refractarietat ventricular

Tant els valors del període refractari ventricular efectiu com funcional dels cors d'animals entrenats van ser majors respecte als valors obtinguts en el grup control en tots els trens d'estimulació realitzats (fig. 3.11. i taula 3.9. en annex).

El període refractari efectiu ventricular va augmentar en el grup de conills entrenats *versus* controls independentment del tren base d'estimulació utilitzat. Així els resultats obtinguts per a cadascun dels trens van ser:

- A un 10% menor del cicle sinusal bàsic va ser un 24,8%.
- A 250 ms va ser un 14 % major.
- A 200 ms va ser un 11,1 % major.
- A 150 ms va ser un 10,1 % major

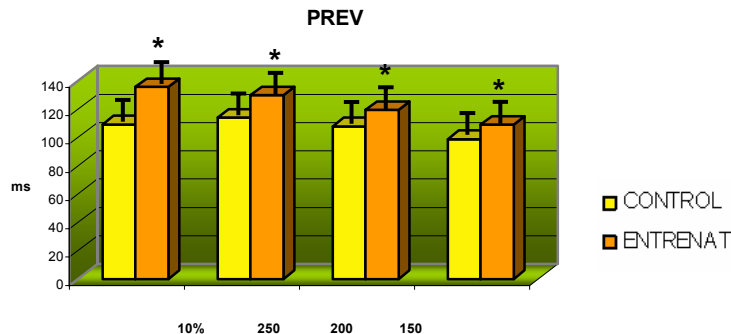


Fig. 3.11. Efecte de l'entrenament sobre el PREV. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

Respecte al període refractari funcional ventricular va augmentar en el grup de conills entrenats *versus* controls independentment del tren base d'estimulació utilitzat (fig. 3.12. i taula 3.10. en annex). Així els resultats obtinguts per a cadascun dels trens van ser:

- A un 10% menor del cicle sinusal bàsic va ser un 17,9%.
- A 250 ms va ser un 11,4 % major.
- A 200 ms va ser un 9,8 % major.
- A 150 ms va ser un 7,9 % major.

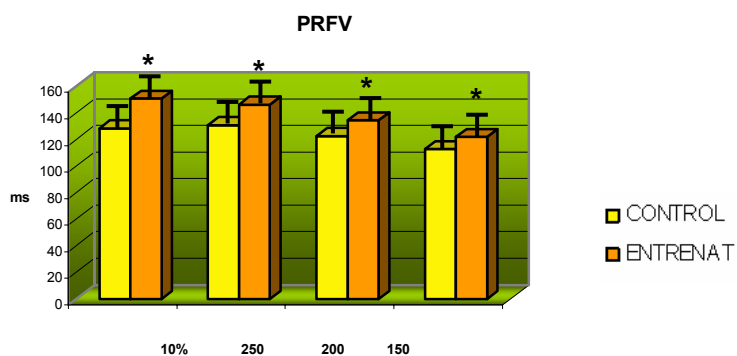


Fig. 3.12. Efecte de l'entrenament sobre el PRFV. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

3.4. Freqüència de la fibril·lació ventricular (FV)

La freqüència dominant mitjana de la FV dels cors dels conills entrenats va ser un 18,4 % menor que la dels controls.

En relació amb la freqüència dominant màxima i mínima de la FV *versus* control no es van obtenir diferències significatives (fig. 3.13. i taula 3.11. en annex).

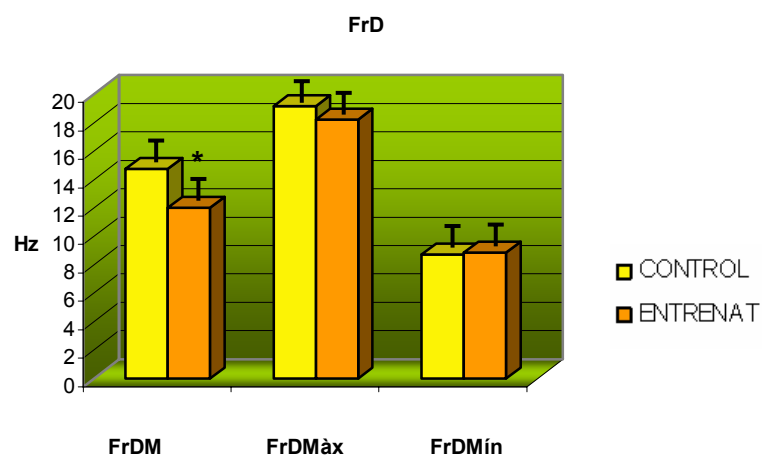


Fig. 3.13. Efecte de l'entrenament sobre la freqüència dominant. * $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

3.5. Concentració plasmàtica de lactat

Respecte a la concentració de lactat plasmàtic determinada en la primera setmana d'entrenament trobem un augment en tots els temps analitzats respecte a la concentració basal.

Recordem que es van realitzar 4 determinacions per sessió d'entrenament: una abans de començar la sessió de carrera contínua, que denominarem *basal* o *temps 0*; una, transcorreguda la primera sèrie de la sessió d'entrenament, a la que anomenarem *temps 1*; una, transcorreguda la tercera sèrie d'entrenament, que serà la *temps 2* i finalment, després de la sexta sèrie d'entrenament o *temps 3*.

Així si analitzem amb més detall aquests resultats tenim un augment d'un 86,1 % en el temps 1, un 114,1 % en el temps 2 i un 96,4 % en el temps 3. Així mateix, les concentracions plasmàtiques de lactat en cada temps, analitzades en la quarta setmana d'entrenament *versus* la seua concentració basal també van ser majors, sent un 71,3 % major per al temps 1, un 45,7 % per al temps 2 i un 30,4 % per al temps 3.

Finalment, en la sexta i última setmana d'entrenament, les concentracions de lactat en sang van ser majors per als temps 1 i 2, però no així per al temps 3 *versus* la seua concentració basal. Trobant un augment del 66,5 % per al temps 1, un

augment del 72,8 % per al temps 2 no trobant diferències estadísticament significatives per al temps 3.

Al comparar dins de cada una de les setmanes estudiades els valors del temps 1, 2 i 3 entre si, no trobem diferències estadísticament significatives.

Finalment, al comparar les concentracions de lactat plasmàtic d'un mateix temps, però en diferents setmanes, trobem una tendència a la disminució entre la primera setmana i l'última setmana d'entrenament en el temps 3 (fig. 3.14. i taula 3.12. en annex).

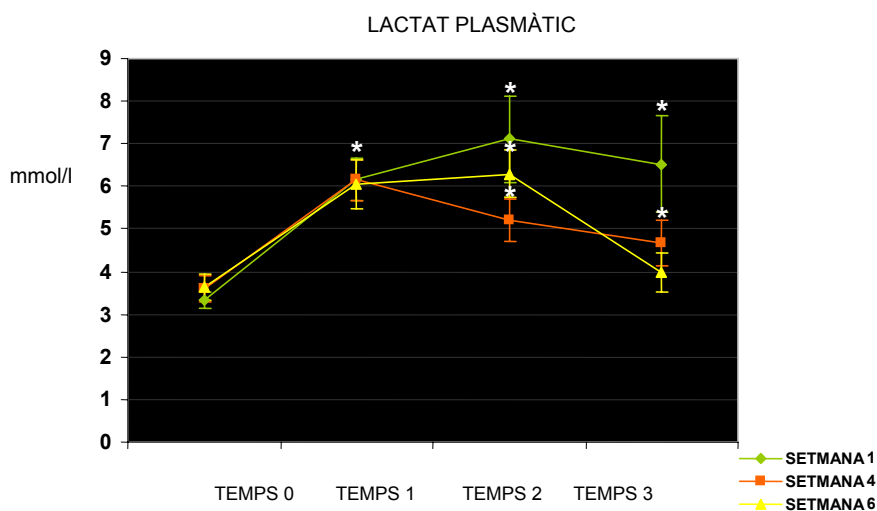


Fig. 3.14. Concentracions de lactat plasmàtic del grup de conills entrenats. Temps 0 correspon a la concentració basal, temps 1 a la determinació després de la primera sèrie, temps 2 a la determinació després de la tercera sèrie i el temps 3 correspon a la determinació final, posterior a l'entrenament. Valors expressats en mmol/L.* $p < 0,05$. El símbol de dispersió utilitzat correspon a l'error estàndard.

3.6. Expressió miocàrdica de HSP60 i iNOS

Després de l'avaluació densitomètrica de les imatges obtingudes amb la tècnica de *Western-blotting* per a les proteïnes miocàrdiques de conill, HSP60 i iNOS, trobem un augment de l'expressió d'aquestes proteïnes en el grup d'animals entrenats (fig. 3.15). Així, el contingut de HSP60 en el cor del grup d'animals entrenats augmentà un $35 \pm 10 \%$ quan es compara amb el grup control. Al respecte de l'enzim òxid nítric sintasa induïble el seu contingut augmentà en el grup d'animals entrenats en un $51 \pm 9 \%$ quan es compara amb el grup control. El nombre de casos analitzats en cada un dels grups va ser de 3.

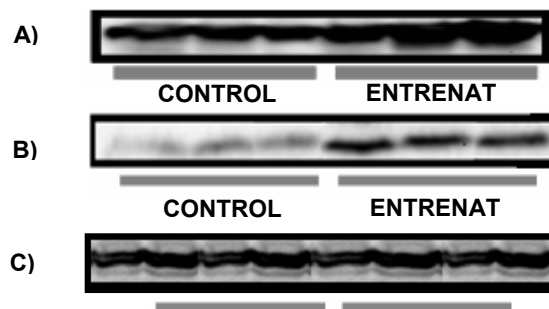


Fig. 3.15. Representació de l'anàlisi de *western-blotting* de proteïnes miocàrdiques induïbles per l'entrenament. A) Expressió de la proteïna HSP60, B) Expressió de la proteïna iNOS i C) α -actina (n=3).

3.7. Automatisme *in vivo*

L'interval V-V en repòs dels cors dels conills abans del seu sacrifici, és a dir, *in vivo* va ser major en el grup de conills entrenats (259 ± 18 ms; n=6) *versus* el grup control (235 ± 33 ms; n=10), amb una $p < 0,05$. És a dir, la freqüència cardíaca mitjana dels cors corresponents al grup de conills entrenats va ser menor que la mostrada pel grup no entrenat (234 *versus* 255 ppm respectivament).

3.8. Flux dels cors

El flux coronari dels cors dels conills va ser per al grup entrenat ($51,05 \pm 10,48$ mil·lilitres per minut; n=13) *versus* el grup control ($48,75$ mil·lilitres per minut; n=11), no es trobaren diferències entre els dos grups.

Al normalitzar aquest flux coronari respecte a la massa del cor obtenim els valors següents, en el grup entrenat $4,64 \pm 0,93$ mil·lilitres per minut per gram (n=13) *versus* $4,52 \pm 0,64$ mil·lilitres per minut per gram en el grup control (n=11), sense obtindre diferències entre ells.

Finalment, al calcular el flux coronari normalitzat amb la freqüència cardíaca obtenim en el grup entrenat un valor de $0,024 \pm 0,004$ mil·lilitres per minut per gram per batecs minut

(n=13) *versus* el grup control amb $0,021 \pm 0,003$ mil·lilitres per minut per gram per batecs minut (n=11), trobant un augment estadísticament significatiu en el grup entrenat.

3.9. Pes dels cors

El pes dels cors dels conills posterior al protocol experimental va ser per al grup entrenat ($11,15 \pm 1,40$ g; n=15) *versus* el grup control ($10,53 \pm 1,81$ g; n=12), sense trobar diferència significativa entre ambdós grups).

3.10. Annex

	V-V	A-V
Control	274 ± 37 (14)	61 ± 6 (11)
Entrenat	320 ± 45* (12)	69 ± 7* (12)

Taula 3.1. Mitjana i desviació estàndard dels valors d'automatisme sinusal i conducció auriculoventricular. V-V: interval V-V, A-V: interval A-V. Valors expressats en ms. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

	VC	LO
Control	98 ± 9 (11)	11 ± 2 (11)
Entrenat	93 ± 9 (13)	12 ± 2* (13)

Taula 3.2. Mitjana i desviació estàndard dels valors de velocitat de conducció (VC) i longitud d'ona (LO). Valors expressats en $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ per la VC i en centímetres per la LO. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

PREA	10%	250	200	150
Control	81±13	78±13	80±13	79±17
	(12)	(7)	(10)	(12)
Entrenat	90±26	86±22	88±24	84±23
	(13)	(13)	(14)	(13)

Taula 3.3. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents al període refractari efectiu auricular amb 4 trens d'estimulació: un 10% menor de la seva freqüència sinusal bàsica, un tren de 250 ms, un tren de 200 ms i un tren de 150 ms. Valors expressats en ms. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

PRFA	10%	250	200	150
Control	97±11	95±9	94±11	95±12
	(12)	(8)	(10)	(12)
Entrenat	107±29	105±28	105±26	100±25
	(13)	(12)	(14)	(13)

Taula 3.4. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents al període refractari funcional auricular amb 4 trens d'estimulació: un 10% menor de la seva freqüència sinusal bàsica, un tren de 250 ms, un tren de 200 ms i un tren de 150 ms. Valors expressats en ms. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

PRESCAV	10%	200
Control	105±3 (2)	100 (1)
Entrenat	128±15 (3)	101±3 (2)

Taula 3.5. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents al període refractari efectiu del sistema de conducció auriculoventricular amb 4 trens d'estimulació: un 10% menor de la seva freqüència sinusal bàsica, un tren de 250 ms, un tren de 200 ms i un tren de 150 ms. Valors expressats en ms. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

PRFSCAV	10%	250	200	150
Control	140±14 (6)	163±10 (3)	131±15 (3)	127±8 (2)
Entrenat	178±29* (8)	171±8* (6)	150±16* (7)	138±12* (8)

Taula 3.6. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents al període refractari funcional del sistema de conducció auriculoventricular amb 4 trens d'estimulació: un 10% menor de la seva freqüència sinusal bàsica, un tren de 250 ms, un tren de 200 ms i un tren de 150 ms. Valors expressats en ms. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

PRESCVA	200	150
Control	146±18 (2)	125±11 (3)
Entrenat	154±12 (2)	141±34 (5)

Taula 3.7. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents al període refractari efectiu del sistema de conducció ventriculoauricular amb 2 trens d'estimulació: un tren de 200 ms i un tren de 150 ms. Valors expressats en ms. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

PRFSCVA	10%	250	200	150
Control	160±11 (9)	161±10 (9)	155±12 (8)	141±6 (4)
Entrenat	175±16 (11)	170±11 (8)	157±17 (10)	157±11 (8)

Taula 3.8. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents al període refractari funcional del sistema de conducció ventriculoauricular amb 4 trens d'estimulació: un 10% menor de la seva freqüència sinusal bàsica, un tren de 250 ms, un tren de 200 ms i un tren de 150 ms. Valors expressats en ms. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

PREV	10%	250	200	150
Control	109±23 (12)	114±14 (10)	108±13 (11)	99±7 (10)
Entrenat	136±20* (15)	130±13* (12)	120±11* (14)	109±14* (14)

Taula 3.9. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents al període refractari efectiu ventricular amb 4 trens d'estimulació: un 10% menor de la seva freqüència sinusal bàsica, un tren de 250 ms, un tren de 200 ms i un tren de 150 ms. Valors expressats en ms. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

PRFV	10%	250	200	150
Control	128±17 (12)	131±7 (10)	122±6 (11)	113±4 (10)
Entrenat	151±20* (15)	146±14* (12)	134±9* (12)	122±7* (12)

Taula 3.10. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents al període refractari funcional ventricular amb 4 trens d'estimulació: un 10% menor de la seva freqüència sinusal bàsica, un tren de 250 ms, un tren de 200 ms i un tren de 150 ms. Valors expressats en ms. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

	FrDM	FrDMàx	FrDMín
Control	14,7±2 (8)	19,2±6 (8)	8,7±3 (8)
Entrenat	12±2* (9)	18,2±8 (9)	8,9±3 (9)

Taula 3.11. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents a la freqüència dominant mitjana (FrDM), a la freqüència dominant màxima (FrDMàx) i a la freqüència dominant mínima (FrDMín) en el minut cinc de fibril·lació ventricular. Valors expressats en Hz. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

LACTAT	TEMPS 0	TEMPS 1	TEMPS 2	TEMPS 3
SETMANA 1	3,32±0,84 (19)	6,18±2,04* (17)	7,11±4,09* (16)	6,52±4,22* (14)
SETMANA 4	3,59±1,35 (20)	6,15±2,08* (19)	5,23±2,17* (19)	4,68±2,08* (15)
SETMANA 6	3,64±1,31 (17)	6,06±2,36* (17)	6,29±2,20* (16)	3,98±1,47 (11)

Taula 3.12. Mitjana i desviació estàndard dels valors corresponents a la concentració plasmàtica de lactat en la primera, quarta i sisena setmana d'entrenament. Temps 0 corresponent a la concentració basal, temps 1 corresponent a la determinació després de la primera sèrie, temps 2 corresponent a la determinació després de la tercera sèrie i temps 3 corresponent a la determinació final, posterior a l'entrenament. Valors expressats en mmol/L. Nombre d'experiments entre parèntesi. *p<0,05.

CAPÍTOL 4

Discussió

4. DISCUSSIÓ

4.1. Consideracions generals

En la present tesi, hem investigat en cors aïllats de conills entrenats en cinta rodant seguint el protocol descrit en el capítol relatiu a metodologia, l'efecte de l'entrenament sobre l'automatisme, la conducció (auriculoventricular, la velocitat de conducció ventricular i la longitud d'ona del procés d'activació), la refractarietat (auricular, del sistema de conducció auriculoventricular, ventriculoauricular i ventricular) i la freqüència dominant de la fibril·lació ventricular.

El present treball s'ha realitzat amb la finalitat d'evidenciar modificacions en els paràmetres esmentats, i que els mecanismes subjacents siguin propis del cor i, per tant, no sotmesos a control nerviós extrínsec i/o humoral.

Com comentem prèviament en el capítol d'*Introducció*, pensem que la nostra investigació posseeix un interès científic bàsic, i de probable aplicació en clínica humana. L'interès científic bàsic, deriva de la relativament escassa informació de què es disposa del problema plantejat; i l'interès en clínica humana deriva dels estudis realitzats per diversos autors sobre l'efecte que produeix l'exercici físic regular sobre la prevenció, directament o indirecta, de diversos tipus d'arítmies cardíaques que són causa de la mortalitat d'origen cardíac (Paffenbarger i Hala, 1975, Ekelund *et al.*, 1988, Blair *et al.*, 1996), com és la

fibril·lació ventricular, que és la causa principal de mort sobtada d'origen cardíac (Billman *et al.*, 2002).

4.2. Consideracions respecte a la metodologia

Hem utilitzat una preparació de cor aïllat a fi d'excloure influències humorals i/o nervioses extrínseques sobre els resultats, i que ha estat usada comunament per a l'estudi d'efectes electrofisiològics directes o intrínsecs de fàrmacs o de diverses manipulacions com són l'estirament, lesions per radiofreqüència, variacions tèrmiques, hipòxia global, exercici físic, etc. (Chorro *et al.*, 1997, 1999, 2000b i 2005; Such *et al.*, 2002).

El model de cor aïllat de conill requereix per a la seua perfusió líquids de fàcil disponibilitat i preparació com per exemple ho és la solució de Tyrode, la qual cosa representa un avantatge si ho comparem amb les necessitats per perfundir el cor d'animals com el gos, que requereix sang per a la seua perfusió; a més, és de fàcil manipulació, la qual cosa li dóna també avantatges respecte al cor d'animals més xicotets com és el de rata o cobai. Altres animals com el ratolí, que té una massa ventricular xicoteta i una freqüència cardíaca molt ràpida, amb una duració curta de potencial d'acció, no són un bon model per a l'estudi de la fibril·lació ventricular. En aquest animal és extremadament difícil la inducció de la fibril·lació ventricular, així com el manteniment en el temps de la mateixa,

ja que els circuits reentrants que són necessaris per a la propagació de la fibril·lació ventricular, difícilment es formen en aquestos animals, tal com exposa Billman (2002) en una revisió.

Respecte al model amb gossos, avala la seua utilització que poden ser instrumentalitzats per realitzar estudis longitudinals i que s'ha vist per l'entrenament una sèrie d'efectes, com ara la reducció de la freqüència cardíaca, la disminució del despesa cardíaca i la invariabilitat del volum sistòlic. Reidhammer *et al.* (pres de Schaible i Scheuer, 1985) van relatar un xicotet increment en la massa del cor i un menor increment en la pressió i en el volum telediastòlics en els entrenats, així com un increment de la contractilitat. Així mateix, s'ha evidenciat un augment del dP/dt , en gossos entrenats (Stone, pres de Schaible i Scheuer, 1985).

Les rates de laboratori són els animals més sovintment utilitzats en experiments de condicionament cardíac. Això és a causa del fet que presenten una constitució genètica ben definida, un baix cost econòmic i la possibilitat de poder entrenar diverses simultàniament. D'altra banda, presenta una sèrie de desavantatges, com són la seua alta freqüència cardíaca, que dificulta els estudis dependents d'aquesta, una grandària cardíaca molt xicoteta que va en perjuí d'una instrumentalització prolongada, la qual cosa impedeix realitzar estudis longitudinals (Schaible i Scheuer, 1985).

Respecte a l'animal utilitzat en aquest estudi, comentarem que el conill és un animal considerat per molts autors com l'ídoni per a estudis sobre efectes de l'entrenament, ja que el conill de laboratori és, a semblança dels humans en general, sedentari, i amb protocols d'exercici d'intensitat, duració i freqüència apropiades, i s'obté molt fàcilment una resposta cardiovascular pròpia a l'entrenament (DiCarlo *et al.*, 1990).

Finalment, el fet que hagem usat una preparació tipus Langendorff, sense postcàrrega, i amb una lleugeríssima precàrrega, i no siga per tant una preparació de *Working Heart*, ens permet assegurar que les diferències observades entre els grups no poden atribuir-se a diferències en el treball cardíac. La lleugeríssima precàrrega a què hem fet menció es referix al ventricle dret, a causa del Tyrode que perfundeix l'arbre coronari i que retorna a aquest ventricle sent expulsat per l'artèria pulmonar. Considerem que aquesta variable hemodinàmica no afecta en absolut als resultats de l'estudi, ja que, a banda de ser mínima la precàrrega dreta, hem explorat, tant la refractarietat com la velocitat de conducció i la freqüència dominant, en el ventricle esquerre.

Per a comprovar que el protocol d'entrenament utilitzat, és un protocol aeròbic, realitzem el control de dos variables, ambdues, característiques dels processos d'entrenament aeròbic:

1) Registre de la freqüència cardíaca *in vivo* (en repós) i *in vitro* (De Schryver *et al.*, 1975; Blomqvist i Saltin, 1983; Bedford i Tipton, 1987; Scheuer i Tipton, 1997) ja que una disminució significativa de la freqüència cardíaca, suggeriria haver estat davall la influència d'un entrenament aeròbic.

2) Proves de lactat (López-Chicharro i Fernández, 2001, i Astrand *et al.*, 1992).

Com ja s'ha comentat, d'entre els possibles mètodes invasius per a la determinació del llindar anaeròbic es va triar l'anàlisi de la concentració de lactat en sang per la seua gran facilitat de realització, utilització i reproductibilitat. A més, l'obtenció de la mostra de sang resulta simple, la quantitat necessària molt menuda i la tècnica relativament innòcua per al conill.

A més d'això, realitzem dos estudis, que encara que no són específics de l'entrenament aeròbic, sí que són uns demostrats indicadors d'adaptació a l'entrenament. Aquests han estat:

1) Expressió de l'enzim òxid nítric sintasa induïble (iNOS) en miocardi. Ha estat demostrat l'augment de l'expressió de l'enzim iNOS, a més d'augment dels nivells de NO, en miocardi, de rates sotmeses un entrenament físic (Husain i Hazelrigg, 2002).

2) Expressió de la proteïna de xoc tèrmic (HSP60). Està establida que la realització d'un exercici físic prolongat incrementa l'expressió de les proteïnes d'estrés de molts òrgans, inclosos el múscul esquelètic i el miocardi (Locke M, 1997 pres de Powers *et al.*, 2001).

4.3. Consideracions respecte als resultats

4.3.1. Respecte a l'automatisme

En el nostre estudi l'efecte cronotròpic negatiu de l'entrenament s'ha evidenciat amb la disminució de la freqüència cardíaca. Els canvis observats en la freqüència cardíaca intrínseca estan d'acord amb anteriors estudis experimentals realitzats en rates (Nylander *et al.*, 1982) i gossos (Ordway *et al.*, 1982). En contraposició, altres estudis en cors aïllats d'animals entrenats no van trobat canvis significatius en la freqüència cardíaca (Tipton *et al.*, 1977). El component intrínsec de la bradicàrdia en els subjectes entrenats ha estat relacionat amb un engrandiment cardíac i amb l'estirada tònica dels marcapassos sinoauricular, fet que podria produir la dilatació auricular en els protocols d'entrenament de resistència (Lewis *et al.*, 1980). Una modificació en el metabolisme dels miòcits cardíacs que resultara en una més eficient utilització i generació de l'energia ha estat suggerida com una causa de la bradicàrdia intrínseca

(Katona *et al.*, 1982). També ha estat relatat en alguns casos que la bradicàrdia és dependent de la síndrome de la malaltia del sinus (Northcote *et al.*, 1989).

4.3.2. Respecte a la conducció

A) En relació amb els efectes de l'entrenament sobre la conducció AV, els nostres resultats estan en concordança amb investigacions prèvies que mostren una depressió de la conducció AV en atletes, en els que es va evidenciar un bloqueig AV de primer grau i, en menor grau, un bloqueig AV de segon grau (Talan *et al.*, 1982, Viitasalo *et al.*, 1982, Viitasalo *et al.*, 1984). Els efectes depressors de l'entrenament sobre la conducció AV han estat atribuïts a un increment del to vagal (Bjørnstad *et al.*, 1993 i Northcote *et al.*, 1989). Els nostres resultats demostren una alteració de la conducció AV en els cors aïllats que provenen dels conills sotmesos al protocol d'entrenament. Hi ha diverses propostes per a explicar els canvis intrínsecs de la conducció deguts a l'entrenament, com per exemple la relatada per Bjørnstad *et al.* (1993), segons la qual hi ha una relació entre l'allargament de l'interval P-Q i la hipertròfia ventricular esquerra, resultats que estan d'acord amb l'augment de la incidència dels bloquejos AV de primer grau en subjectes amb una hipertròfia ventricular esquerra (Bjørnstad *et al.*, 1993). D'altra banda hi ha diferents autors que recolzen la hipòtesi que els bloquejos en atletes estan produïts per un dany miocàrdic (pres de Bjørnstad *et al.*, 1993).

Altres autors també proposen com a possible mecanisme de l'augment de la conducció del node AV una alteració del balanç iònic a través de la membrana, així com efectes bioquímics i mecànics induïts per la dilatació i la hipertròfia (Lewis *et al.*, 1980 i Katona *et al.*, 1982, pres de Stein *et al.*, 2002).

D'altra banda, dades de clínica i investigació indiquen que canvis actius i passius en la mecànica del cor poden tindre relació amb l'inici i propagació de l'excitació cardíaca de forma intrínseca, fenomen conegut com a *feedback mecanoelèctric* (Kohl *et al.*, 1999, pres de Stein *et al.*, 2002). De la mateixa manera, hi ha nombroses evidències acumulades que recolzen el fet que darrere de l'acoblament excitació-contracció, en el que canvis electrofisiològics inicien canvis mecànics en el cor, hi ha un sistema de *feedback*, on canvis mecànics (per exemple l'estirament, Chorro *et al.*, 2005) poden iniciar activitat elèctrica (Nazir *et al.*, 1996).

Such *et al.*, 2002, en un estudi sobre les modificacions de l'entrenament sobre les propietats electrofisiològiques del cor de conills entrenats, van evidenciar l'existència d'una depressió en la conducció AV, ja que hi havia un augment en la longitud del cicle de Wenckebach (LCW) en els animals entrenats. La LCW retrògrada va presentar una important tendència a l'augment, no obstant les diferències no van ser estadísticament significatives. Aquests resultats estan d'acord amb investigacions prèvies que van mostrar una depressió de

la conducció AV en atletes amb bloqueig tipus 1 i en menor grau, bloqueig AV tipus 2.

Pensem que les modificacions electrofisiològiques trobades no es troben lligades a variacions en la massa miocàrdica, ni amb el flux coronari, atès que no hem trobat variacions en aquests paràmetres. Tampoc considerem que puguen estar lligades a un dany miocàrdic produït per l'estrès oxidatiu com a conseqüència de l'entrenament, ja que usant un protocol de major intensitat (0,5 m/s) que l'emprat en aquesta tesi (0,33 m/s), va poder ser demostrat que no hi havia variacions significatives en els nivells de marcadors indirectes d'estrès oxidatiu, entre ells, glutatió i substàncies de reacció amb l'àcid tiobarbitúric (Such *et al*, 2002).

S'ha suggerit recentment la importància que poguera tindre en els fenòmens de conducció miocàrdica i gènesi d'arítmies (Haufe *et al.*, 2007), la isoforma neuronal, amb expressió en el cor, de canals de sodi voltatge dependents (CSVD). Efectivament, el corrent d'entrada de sodi (I_{Na}), pareix estar determinat en el cor per dos tipus de canals: CSVD resistents a la tetrodotoxina (fins fa poc responsabilitzats de la totalitat de la I_{Na}), i CSVD sensibles a la tetrodotoxina, clàssicament coneguda la seua expressió, en neurones i miòcits esquelètics. Aquest últim tipus de canals estaria ubicat en zones específiques del sistema de conducció i del miocardi ventricular. Duclohier (2005), responsabilitza els CSVD sensibles a la tetrodotoxina miocàrdics del 20% de la I_{Na} , per la

qual cosa pensem que si d'alguna manera l'exercici físic tinguera influència sobre l'expressió d'aquests canals (el que podria entendre's com una adaptació) es justificaria, almenys en part, els efectes sobre la conducció AV observats en el nostre estudi. A aquest respecte cal citar la hipòtesi emesa per Haufe *et al.* (2007), en la que es planteja la possibilitat que la incidència d'arítmies durant el transcurs de certes malalties neuropàtiques o miopàtiques, poguera ser secundària a variacions en l'expressió de CSVD sensibles a la tetrodotoxina.

B) Els canvis en la velocitat de conducció s'expliquen per alteracions de la dinàmica dels canals iònics de les cèl·lules cardíaques que constitueixen el teixit excitable (Tormos A, 2005), incloent a les unions estretes (Kléber i Rudy, 2004). També ha estat descrita una disminució de la velocitat de conducció en resposta a disminucions de la concentració extracel·lular de potassi (Lammers *et al.* 1988), que creiem que no seria aplicable en el nostre model de cor aïllat i perfundit amb concentracions estables del citat ió (4,7mM) en el líquid de perfusió. En tot cas, sobre la base dels nostres resultats, el model de protocol d'entrenament realitzat no ha modificat els mecanismes bàsics que determinen la velocitat de conducció. Així mateix, no hem trobat referències en la bibliografia que puguin recolzar els nostres resultats, en el sentit de poder explicar-los o comparar-los.

C) Respecte als valors de la longitud d'ona del procés d'activació en els cors dels animals sotmesos a entrenament,

van ser majors que els obtinguts en els cors d'animals controls, independentment que un dels seus components, la velocitat de conducció, no va ser diferent entre els grups estudiats. Efectivament, els valors de l'altre component, la refractarietat ventricular, sí que va ser major en els conills entrenats, tal com hem vist en el capítol de Resultats.

Considerem que l'augment de la longitud d'ona del procés d'activació miocàrdic per l'entrenament en el nostre estudi és degut a l'augment de la refractarietat ventricular (ja que no hem obtingut variacions en l'altre paràmetre determinant) i que descriurem amb més detall en l'apartat següent.

4.3.3. Respecte a la refractarietat

A) Respecte la refractarietat auricular

Cal destacar que hi ha referències prèvies sobre els efectes de l'exercici físic sobre la refractarietat auricular en el cor *in situ*, encara que contradictòries. En el nostre estudi, no hem obtingut variacions significatives de la refractarietat auricular encara que sí que es pot apreciar una clara tendència a l'augment de l'esmentat paràmetre, tant en el període refractari efectiu, com en el funcional.

B) Respecte a la refractarietat del sistema de conducció AV

En el present estudi també hem investigat els efectes intrínsecs de l'entrenament sobre la refractarietat miocàrdica del sistema de conducció auriculoventricular.

Com s'ha apuntat prèviament en l'apartat de resultats, el nombre de determinacions del període refractari efectiu del sistema de conducció AV ha estat clarament menor que el corresponent al període refractari funcional. Això s'ha degut al fet que durant la realització del test de l'extraestímul auricular, s'ha aconseguit el període refractari auricular abans que el del sistema de conducció AV (per tindre menor duració aquest últim), en la majoria dels experiments.

Such *et al.* (2002), van investigar modificacions electrofisiològiques intrínseques produïdes per la realització d'un protocol d'entrenament d'una intensitat major al de la present tesi en cor aïllat de conill. Entre els resultats obtinguts en l'estudi de la refractarietat, no van trobar modificacions per l'entrenament en la refractarietat del node AV. Cal comentar que a pesar que no van trobar modificacions en el període refractari del sistema de conducció AV (PRSCAV), sí que van trobar una major facilitat per a provocar el bloqueig AV tipus Wenckebach, per mitjà d'estimulació de l'aurícula a freqüències creixents, en els animals entrenats. Aquests autors van plantejar la possibilitat que en els animals entrenats

s'aconsegueix abans el fenomen de *fatiga*. El nombre reduït de períodes refractaris determinats, igual que en el nostre estudi, va poder contribuir a explicar que les diferències en la refractarietat entre els animals entrenats i controls no foren estadísticament significatives.

En el present estudi el nombre d'experiments realitzats ha estat major, i a més s'han usat diversos trens d'estimulació en cada experiment. D'altra banda, la metodologia usada per al registre d'electrogrames ha estat de major fidelitat. No obstant, la limitació en l'obtenció dels períodes refractaris efectius de l'esmentat sistema de conducció AV, per les raons ja exposades, han estat igualment presents.

Així, encara que no es van obtenir diferències entre els valors del període refractari efectiu del sistema de conducció AV (PRESCAV) dels dos grups estudiats, sí que es va obtenir un augment en el període refractari funcional (PRFSCAV) dels animals entrenats en tots els trens d'estimulació realitzats.

En aquest sentit, Stein *et al.* (2002), van trobar un increment del període refractari del node auriculoventricular en humans entrenats i sotmesos a bloqueig del sistema nerviós autònom, simpàtic i parasimpàtic, amb la finalitat d'analitzar modificacions intrínseques. Com ja es va comentar en l'apartat de conducció auriculoventricular aquests autors atribueixen aquesta modificació a una alteració del balanç iònic a través de la membrana, així com a efectes bioquímics i mecànics induïts

per la dilatació i la hipertròfia. Aquests canvis actius i passius en la mecànica del cor poden tindre relació amb el fenomen conegut com a *feedback mecanoelèctric*.

En el ventricle, Natali *et al.* (2002) han obtingut resultats semblants als nostres, però analitzant la duració del potencial d'acció (PA) dels cardiomiòcits procedents de l'epicardi ventricular. Aquests autors van trobar, en rates entrenades amb un sistema que els permetia realitzar exercici físic a voluntat, una prolongació de la duració del potencial d'acció (DPA) dels cardiomiòcits procedents d'animals entrenats en comparació amb els controls. Aquests autors atribueixen aquesta modificació a canvis en la morfologia i fisiologia del cor trobant una hipertròfia concèntrica més significativa en cèl·lules subendocàrdiques de les rates entrenades. Els principals mecanismes d'adaptació a l'exercici que podria facilitar un augment en la despesa cardíaca són l'augment regional en la grandària cel·lular que augmenta la força contràctil absoluta i l'augment del mecanisme de Frank-Starling, el qual podria augmentar la contractilitat per a un nivell de dilatació ventricular donat. Les alteracions regionals en l'activitat dels canals iònics pareixen explicar les alteracions observades en DPA, com seria una disminució del corrent repolaritzat de K^+ com el corrent transitori d'eixida de K^+ , I_{to} , i el corrent rectificador intern, I_{K1} , (Shipsey *et al.*, 1997).

Els nostres resultats no mostren cap relació entre les modificacions electrofisiològiques del sistema de conducció AV

i un augment de la massa cardíaca, ja que el pes dels cors dels animals entrenats i el dels controls no difereixen significativament, com ha quedat exposat en l'apartat de resultats. Tampoc poden ser atribuïts a variacions del flux coronari, ja que tampoc hem trobat diferències.

Respecte als mecanismes que explicarien les possibles variacions en la refractarietat del sistema de conducció auriculoventricular dels cors aïllats d'animals entrenats, no hi ha estudis realitzats. Per tant, cabria la possibilitat d'especular que els mecanismes subjacents en la disminució de la conducció del node AV (comentats anteriorment), estiguen també implicats en l'augment del període refractari funcional del sistema de conducció AV.

En qualsevol cas, considerem no sols que la realització d'entrenament augmenta el període refractari funcional del sistema de conducció AV, sinó que a més ho fa a través de mecanismes lligats al propi cor, ja que la nostra preparació exclou influències nervioses extrínseques i humorals.

Aquests resultats, podrien ser d'especial transcendència, ja que indicarien que l'exercici físic podria potenciar la funció de filtre del node AV enfront de les taquicàrdies auriculars, dificultant així la possibilitat que aquestes repercutisquen més sensiblement sobre la funció ventricular.

C) Respecte a la refractarietat del sistema de conducció VA

A la vista dels resultats obtinguts, l'entrenament no pareix actuar sobre la refractarietat del sistema de conducció ventriculoauricular.

Aquestes dades són semblants a les obtingudes en l'estudi de Such *et al.* (2002) on no es van obtenir modificacions de tal paràmetre, encara que el protocol d'entrenament fóra de diferent intensitat del realitzat en aquests estudi.

D) Respecte a la refractarietat ventricular

Com hem pogut veure en el capítol de Resultats, la realització del protocol d'exercici físic ha produït un augment del període refractari efectiu i funcional del ventricle.

Aquests resultats són semblants als obtinguts en treballs com Such *et al.* (2002), encara que, com ja s'ha comentat, el protocol d'entrenament era de major intensitat. No obstant, els resultats ací exposats són més concloents ja que en aquells el nombre de dades fou menor, a causa de limitacions metodològiques relacionades amb el registre dels electrogrames, possible raó per la qual no van trobar diferències significatives en quant al període refractari efectiu es refereix, entre els cors procedents d'animals entrenats i els

controls; només es va observar, una important tendència a l'augment sense significació estadística.

En el present estudi el nombre de períodes refractaris efectiu i funcional analitzats, ha estat superior, i la metodologia utilitzada per al registre d'electrogrames ha estat de major fidelitat (digital i no analògica), per la qual cosa, com hem indicat en línies anteriors, l'estudi corresponent a aquest efecte de l'entrenament sobre la refractarietat és més concloent.

Podem concloure no sols que la realització d'un entrenament augmenta la refractarietat ventricular, sinó que a més ho fa a través de mecanismes lligats al mateix cor, ja que la preparació exclou, com ja hem comentat, influències nervioses extrínseques i humorals.

Altres autors han obtingut resultats que apunten en el mateix sentit que els nostres pel que fa a la duració del potencial d'acció global o parcialment es refereix (Tibbits *et al.*, 1981, Gwathmey *et al.*, 1990, Jew *et al.*, 2000). Més recentment Natali *et al.* (2002) en rates entrenades segons s'ha descrit anteriorment, van trobar també una prolongació de la DPA en cardiomiòcits procedents de l'epicardi ventricular.

Diem que en el present estudi hem observat resultats que apunten en el mateix sentit als dels anteriors autors, perquè encara que ells no van realitzar pròpiament un estudi sobre la refractarietat miocàrdica, sí que ho feren sobre la DPA. La

correspondència o correlació entre el PRE i el PA ha estat estudiada per Sutton *et al.* (2000) en el cor humà sota condicions control. Aquests autors van observar que en les condicions mencionades el PRE es va aproximar a la DPA monofàsica i per tant la correlació entre ells era bona, si bé en condicions anormals com era el cas de la isquèmia, aquesta correlació es perdia, ja que, encara que la duració del potencial d'acció monofàsic disminuïa, la duració del PRE augmentava. Segons Downar *et al.* (1977), després d'estudiar l'efecte de la isquèmia en un cor de porc, en cloure l'artèria coronària, van observar, inicialment, una disminució de la duració i de l'amplitud del potencial d'acció monofàsic correlacionat amb una disminució dels períodes refractaris. Posteriorment, van trobar un allargament dels períodes refractaris seguit d'un acurtament de la DPA. Aquest fenomen s'anomena refractarietat postrepolarització.

Nosaltres també observem en treballs recents un augment de la refractarietat ventricular tant efectiva com funcional investigant aquests paràmetres en els cors aïllats d'animals entrenats (López *et al.*, 2005b).

Feta l'excepció dels treballs d'investigació que acabem de comentar, no hem trobat en la bibliografia cap encaminat a l'anàlisi de la modificació de la refractarietat intrínseca per l'entrenament.

Desconeixem els mecanismes bàsics pels quals els períodes refractaris foren majors en els animals entrenats. A pesar d'això, i sobre la base d'experiments realitzats per altres investigadors, podem implicar a nivell electrofisiològic cel·lular a certs corrents i/o transportadors iònics. Així, Jew *et al.* (2001) van trobar, en cardiomiòcits aïllats de ventricle esquerre de rates sotmeses a entrenament, i utilitzant la tècnica de *patch-clamp*, que l'entrenament produeix: a) una reducció en la densitat dels corrents repolaritzants de potassi d'inactivació lenta o sostinguda, a les quals ells i altres autors van denominar I_{sus} (I_{late}) (Himmel *et al.*, 1999), i b) alhora que també van trobar un increment en la rapidesa a què s'aconsegueix el pic del corrent I_{to} que, com és sabut, és aquest un corrent d'eixida de potassi transitòria i responsable de l'inici de la repolarització ràpida del cardiomiòcit i un tènue però significatiu increment en la densitat de corrents I_{to} en els cardiomiòcits del ventricle esquerre de la rata aïllats. Per a aquests autors també l'entrenament paregué afectar l'amplitud del pic i a la forma de la fase de repolarització primerenca del PA registrat en miòcits aïllats de cultius.

Les anteriors observacions podrien contribuir a les adaptacions sobre el PA induïdes per l'entrenament, que com ha estat prèviament publicat produeix un allargament del PA (Tibbits *et al.*, 1981, Gwathmey *et al.*, 1990, Natali *et al.*, 2002).

No obstant, Aquests autors no van determinar quins dels components específics d'aquests corrents que contribueixen a I_{sus} (I_{late}) i I_{to} són afectats per l'entrenament, ni van determinar si

les adaptacions dels corrents repolaritzants de K^+ , voltatge dependent, són regionalment variables en el miocardi ventricular.

Cabria també la possibilitat que l'entrenament poguera modificar l'activitat de d'intercanviador Na^+/Ca^{2+} que com és sabut té propietats electrogèniques i podria variar la DPA. En aquest sentit, Mace *et al.*, 2003, van realitzar un estudi en cardiomiòcits aïllats de rates, respecte a la influència de l'edat i l'entrenament en tapís rodant sobre d'intercanviador Na^+/Ca^{2+} , i van trobar que es va incrementar l'activitat d'aquest en l'envelliment, així com la DPA mesurat al 75% i al 90% del valor de repòs des del nivell màxim de potencial. Per a aquests autors, l'increment de l'activitat de d'intercanviador Na^+/Ca^{2+} podria ser una possible explicació de la prolongació del PA en la fase tardana en els animals vells. No obstant, l'entrenament no va modificar els resultats anteriors. Aquestes consideracions, a banda de la diferent metodologia emprada, ens fan suposar que en el nostre cas no ha participat el sistema de transport mencionat en l'allargament de la refractarietat miocàrdica.

Mokelke *et al.*, 1997, per a investigar la participació d'altres mecanismes iònics en les modificacions electrofisiològiques causades per l'entrenament, van estudiar en cors de rates sotmeses a un protocol de resistència sobre cinta rodant, l'acció dels corrents de calci que contribueixen a formar l'altiplà

del PA en cardiomiòcits ventriculars; com és sabut es tracta d'un corrent d'entrada de calci lenta (I_{Ca}), i que transcorre pels canals tipus L de Ca^{2+} , voltatge-dependents. El treball el van dissenyar a partir de les teories que apunten que els canals de calci ja mencionats, podien patir adaptacions electrofisiològiques i mecàniques (Tibbits *et al.*, 1981, Gwathmey *et al.*, 1990, i Moore *et al.*, 1993). Donades les anteriors investigacions, Mokolke *et al.*, 1997, no van trobar modificacions en la dependència del voltatge d' I_{Ca} , ni en el pic d' I_{Ca} produït després del protocol d'exercici físic, durant els experiments duts a terme mitjançant la tècnica de *voltage-clamp*. Tampoc van trobar que la inactivació i la recuperació d' I_{Ca} del conjunt cel·lular foren modificades per l'entrenament, la qual cosa descartava la hipòtesi que les adaptacions induïdes per l'entrenament pogueren recolzar-se en modificacions de la funció i el nombre dels canals de calci tipus L. En aquest treball es va deixar oberta la porta a futures investigacions sobre els canvis per l'entrenament en els corrents repolaritzants de K^+ que podrien produir canvis en I_{Ca} , en absència d'adaptacions intrínseques en el nombre i funció dels canals de calci tipus L, aspectes ambdós ja relatats ací. A més, es va investigar un altre paràmetre, la capacitància de la membrana dels miòcits ventriculars. Aquesta es va emprar, com a mètode indirecte, per a mesurar el volum dels miòcits i que donada la naturalesa irregular dels mateixos, és difícil de determinar. L'increment en la capacitància dels cardiomiòcits, va demostrar que de manera intrínseca hi havia hagut una hipertròfia cel·lular en el ventricle, després de l'entrenament.

Com és conegut, la refractarietat miocàrdica és una propietat, junt amb la velocitat de conducció, que determina la longitud d'ona del procés d'activació miocàrdic, que és un factor relacionat amb l'aparició i l'estabilització d'arítmies reentrants respecte al temps (Wijffels *et al.*, 1995). En aquest sentit, l'increment dels períodes refractaris a causa de l'entrenament és un efecte protector enfront de les alteracions elèctriques, i segons la nostra opinió, podria participar com un mecanisme bàsic pel que la realització d'exercici físic aerobi exerceix un efecte protector enfront de les arítmies reentrants que produeixen la mort sobtada, i també és proposat com un factor en la intervenció enfront de les arítmies, de caràcter no farmacològic (Billman, 2002).

Com ja hem comentat en el capítol d'*Introducció*, Hamra i Mc Neil (1997) van realitzar un estudi dirigit a investigar en fragments aïllats de cor de gos sotmès a entrenament físic, la variació de l'antagonisme accentuat (efectes antagònics de l'acetilcolina sobre l'acció de l'isoproterenol sobre la duració del PA) i van trobar una absència de variacions en tal fenomen en els animals entrenats respecte als controls. És a dir, si bé l'acetilcolina va antagonitzar l'acceleració de la repolarització en els fragments de cor procedents d'animals sotmesos a entrenament, aquest efecte no fou significativament diferent en els animals no entrenats.

Si bé no hem trobat referències respecte a aquest efecte de l'entrenament ni sobre la refractarietat miocàrdica en el cor *in situ*, ni sobre el cor aïllat, tampoc les conclusions sobre els efectes de l'augment del to vagal (situació fisiològica a què s'arriba per l'entrenament) sobre la refractarietat ventricular són concloents, com també hem apuntat prèviament en el capítol d'*Introducció*.

4.3.4. Respecte a la freqüència de la fibril·lació ventricular

Un altre dels paràmetres analitzats en el present estudi ha estat els efectes directes de l'entrenament sobre algunes característiques de la fibril·lació ventricular (FV) induïda per mitjà d'estimulació ventricular a freqüències creixents. Com hem comentat en l'apartat de *Material i Mètodes*, realitzem un anàlisi espectral de la FV per a avaluar els canvis en la freqüència dominant.

La freqüència dominant és usada per a expressar la informació morfològica i periòdica continguda en un senyal. La transformació del domini del temps a domini de la freqüència es realitza amb la transformada de Fourier, com hem comentat en capítols anteriors, permetent-nos així examinar el senyal elèctric com una funció de freqüència. Diferents autors han aplicat l'anàlisi de la freqüència dominant en estudis electrofisiològics cardíacs (Chorro *et al.*, 2000b i Ropella, 2001). Per una altra part, la freqüència dominant i les

freqüències mitjanes són predictives de l'èxit dels xocs elèctrics desfibril·lators en humans (Strohmenger *et al.*, 1997). El dany metabòlic produït per la fibril·lació ventricular modifica les característiques espectrals de la FV i la protecció contra aqò atenua aquests canvis. L'estabilitat de la freqüència dominant de la FV és indicativa d'efectes protectors, d'ací que l'absència de canvis en aquest paràmetre siga un bon indicador de la falta de modificacions electrofisiològiques. D'altra banda, en el nostre model experimental de cor aïllat i perfundit, la freqüència dominant de la FV està relacionada amb propietats electrofisiològiques del miocàrdic ventricular com la refractarietat (Chorro *et al.*, 2000a) constituint per ella mateixa altra propietat electrofisiològica. Per tant, els canvis en aquest paràmetre són un bon marcador de les modificacions electrofisiològiques.

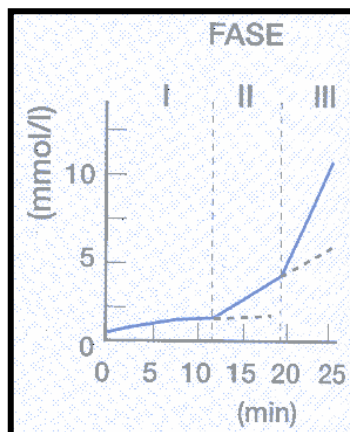
En el present estudi, els valors de freqüència dominant mitjana dels cors dels conills entrenats foren menors que els valors obtinguts en els cors dels conills controls, tal com es va comentar en el capítol de resultats.

L'entrenament per tant, disminueix la freqüència dominant de la FV, augmentant la freqüència de l'activació miocàrdica durant l'arítmia i desaccelerant-la. Aquests resultats són semblants a les modificacions de la refractarietat per l'entrenament descrites, i els mecanismes bàsics que expliquen aquests efectes podrien estar relacionats amb les modificacions

dels mateixos corrents iònics que proposem per a explicar els canvis en la refractarietat.

4.3.5. Respecte a la concentració de lactat plasmàtic

Com és conegut, durant (no al principi) la realització d'un exercici amb càrregues lleugeres i moderades, no s'observa un increment en la concentració sanguínia de lactat per damunt dels valors de repòs, però una vegada superada certa intensitat, diferent per a cada subjecte, augmenta aquesta concentració seguint un model trifàsic descrit per Skinner i McLellan l'any 1980 (pres d'Astrand *et al.*, 1992, i López-Chicharro i Fernández, 2001).



Aquests autors van descriure la transició del metabolisme aeròbic al metabolisme anaeròbic durant la realització d'un exercici incremental a través del model trifàsic (fig. 4.1) i van associar una major participació del metabolisme aeròbic a la fase I i a la fase II, és a dir, a la fase *d'estat estable* i fase *d'increment estable* de la concentració de lactat en sang, respectivament.

Així, la fase I, o *d'estat estable*, es produeix durant les primeres fases d'un exercici incremental, quan la intensitat és baixa i hi ha poca producció de lactat i la fase II, o d'increment estable es produeix a mesura que la intensitat d'exercici augmenta, i una vegada aconseguit un punt entorn del 55-60% del $VO_{2m\acute{a}x}$, on s'observa un augment en la concentració de lactat en sang que sol correspondre aproximadament al doble del valor de repòs. Mentre que van associar una major participació del metabolisme anaeròbic a la fase III o fase *d'augment continu i brusc* de la concentració de lactat plasmàtic. Aquesta fase es produeix si es continua augmentant la intensitat del treball realitzat.

Considerant els esdeveniments descrits anteriorment, Skinner i McLellan van suggerir que l'augment inicial en la concentració de lactat en sang i l'increment no lineal de la ventilació en la fase II estan més lligats al reclutament de fibres tipus I i menys a l'anaerobiosi, suggerint que es denomina llindar aeròbic al punt en què es produeixen aquests fets. D'altra banda com l'augment brusc en la concentració de lactat i la ruptura de l'augment lineal de la ventilació que s'observen en la fase III estan més relacionats amb l'anaerobiosi, els mateixos autors van suggerir que aquest fenomen de la fase III es denomina llindar anaeròbic.

García Manso *et al.* (1996) afirmen que quan la intensitat de l'esforç és inferior al llindar anaeròbic (± 60 del $VO_{2m\acute{a}x}$), inicialment s'observa una xicoteta pujada de la concentració

plasmàtica d'àcid làctic, però amb valors molt xicotets respecte als valors màxims que es podrien arribar a aconseguir amb intensitats majors d'esforç. També relata que amb la continuació d'aquests esforços de baixa intensitat, els nivells de lactat plasmàtic retornen als valors de repòs. Els resultats de la nostra investigació estan en concordança amb aquesta última idea, ja que hem obtingut que durant la sexta i última setmana d'entrenament les concentracions de lactat en sang en el temps 3 tornen a la seua concentració basal.

Segons Astrand *et al.*, (1992) durant l'exercici d'intensitat moderada, els processos anaerobis contribueixen a l'eixida d'energia al començament de l'exercici fins que l'oxidació aeròbia té lloc i cobreix completament la demanda energètica i a mesura que continua l'exercici, la concentració de lactat en sang cau novament a nivell de repòs. Aquesta afirmació d'Astrand *et al.*, (1992), coincideix en gran manera amb els resultats obtinguts per en el protocol d'entrenament emprat en aquest treball.

No hem trobat en la bibliografia estudis que relaten l'evolució de les concentracions de lactat en sang de conills sotmesos a un protocol d'entrenament semblant a l'utilitzat per nosaltres, encara que sí en altres espècies animals com per exemple la rata (Votarell *et al.*, 2002), i per descomptat en l'ésser humà. Per això, la nostra discussió a aquest respecte serà comparativa amb els resultats obtinguts en humans.

Com hem comentat anteriorment en el capítol de Resultats, tant en la primera setmana d'entrenament com en la quarta setmana d'entrenament, totes les concentracions de lactat determinades en el temps 1, 2 i 3, foren majors que la concentració basal, i en comparar els valors de les determinacions en els diferents temps d'una mateixa sessió d'entrenament no trobem diferències estadísticament significatives entre els temps 1, 2 i 3, és a dir, es produeix un augment de la concentració de lactat inicial que es manté en el temps fins a acabar l'entrenament. Aquest resultat es relaciona amb les fases aeròbiques del model trifàsic de Skinner i McLellan (1980), en les quals es produeix un lleuger augment de la concentració de lactat sense arribar a la fase anaeròbica en què té lloc un augment continu i brusc de la dita concentració. Segons Arcelli E, 1991 (pres de García Manso, 1996) aquest augment és degut a diferents factors com la reduïda eficiència en l'aportació d'oxigen (retard tant en l'adaptació central com en les adaptacions perifèriques) i la intervenció d'un percentatge elevat de fibres poc eficients des del punt de vista aeròbic.

Els resultats obtinguts en la sexta setmana d'entrenament mostren que es produeix un augment de la concentració de lactat plasmàtic respecte a la basal en els temps 1 i 2, mentre que en el temps 3 no es van trobar diferències estadísticament significatives respecte a la concentració basal. Aquest resultat es relaciona amb els treballs anteriorment exposats de García Manso *et al.* (1996) i Astrand *et al.* (1992) on exposen que,

amb l'entrenament aeròbic després d'una resposta inicial a l'esforç, es constata un descens dels valors de concentració de lactat plasmàtic semblants als valors de repòs. Segons Arcelli E, 1991 (pres de García Manso, 1996) aquest retorn als valors inicials és degut a l'adequada aportació d'oxigen a les fibres en acció, que podríem considerar, en principi, com una adaptació al protocol d'entrenament, com a continuació exposem.

En comparar els valors obtinguts en el temps 3 de la primera setmana d'entrenament amb els valors d'aqueix mateix temps, però en la sexta setmana d'entrenament, trobem una tendència a la disminució, és a dir, pareix existir un descens dels valors de concentració de lactat en el temps 3 transcorregudes les sis setmanes. Segons diversos autors com López-Chicharro i Fernández, 2001, hi ha una relació entre la disminució de les concentracions de lactat en sang i l'entrenament aeròbic. Com ja es va comentar en el capítol d'*Introducció* tals autors expliquen aquest augment de la capacitat oxidativa per un augment en el nombre, la grandària i superfície de les mitocondries del múscul esquelètic; un increment del nivell d'activitat o de la concentració dels enzims involucrats en el cicle de Krebs i en el sistema de transport d'electrons; i un increment de l'oxidació dels greixos, el que suposa un menor cúmul d'àcid làctic.

Altres resultats obtinguts en la present tesi que recolzen l'existència d'adaptació són:

K) El descens de la FC en repòs, *in vivo* i *in vitro*, trobats en el grup de conills entrenats enfront del grup control. La relació entre l'entrenament aeròbic i la disminució de la freqüència cardíaca en repòs és ben coneguda, De Schryver *et al.* (1974), Blomqvist i Saltin (1983).

L) L'augment de l'expressió de proteïnes induïbles per l'entrenament com l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS) ha estat demostrat per diferents autors. Així, Gómez-Cabrera *et al.* (2005) van relacionar l'augment de l'expressió de proteïnes vitals amb les adaptació produïdes per l'exercici físic crònic (durant 8 setmanes) amb dos protocols d'intensitat diferents. Entre aquestes proteïnes es troben la iNOS i les HSP. Així mateix, en estudis realitzats per Husain i Hazelrigg (2002) s'ha demostrat l'augment de l'expressió de l'enzim iNOS, a més d'augment dels nivells de NO en miocardi de rates sotmeses a entrenament físic. Parrat *et al.* (1997) (pres de Hajnal *et al.*, 2005), suggereixen com a mecanisme pel qual s'eleven els nivells de NO per l'entrenament, l'estimulació endotelial per l'alliberament de bradicinina. D'altra banda, l'augment de l'expressió de l'esmentat enzim, podria explicar el resultat obtingut en el nostre estudi en relació amb el flux coronari. Efectivament, el flux coronari dels conills entrenats respecte al dels controls, una vegada normalitzat per gram de teixit i freqüència cardíaca, fou significativament major; el que podria explicar-se per un increment en la síntesi d'òxid nítric i els efectes vasodilatadors produïts en conseqüència. No obstant,

hem de recordar que en aquest estudi no hem quantificat l'activitat de la iNOS, només la seua expressió, i que com acabem de mencionar, està incrementada en el grup de conills entrenats.

M) L'augment de l'expressió de proteïnes induïbles per l'entrenament com **HSP60**. Així, en investigacions prèvies es va demostrar que l'entrenament de resistència en humans i animals augmenta el potencial oxidatiu del múscul esquelètic, i que les proteïnes HSP són necessàries per a la protecció i síntesi de precursors enzimàtics oxidatius (Dudley, 1982). Més recentment, Powers *et al.* (2001), van relatar que l'entrenament de resistència podia augmentar l'HSP72 en un 400%-500% en el miocardi d'animals joves. Alguns dels mecanismes pels quals l'exercici pot augmentar l'expressió d'HSP són l'increment de la temperatura dels teixits, l'estrès oxidatiu, la depleció de les reserves de glucosa i glucogen, la isquèmia, la hipòxia, l'increment dels nivells de Ca^{2+} intracel·lular i la disminució del pH intracel·lular (Benjamí *et al.*, 1990; Knowlton, 1997; Locke, 1997; Powers i Tanguay, 1996; pres de Powers *et al.*, 2001).

Per tant, sobre la base dels resultats obtinguts tant en indicadors inespecífics d'entrenament com en aquells més específics d'entrenament aeròbic, considerem que els conills utilitzats en aquest estudi, sotmesos a un protocol d'entrenament com el descrit en el capítol corresponent, han mostrat en diversos paràmetres analitzats, resultats

compatibles amb una adaptació pròpia d'un entrenament físic, en concret, de tipus aeròbic.

4.3.6. Consideracions finals respecte als resultats obtinguts

Una vegada finalitzada la discussió pròpia de cada un dels paràmetres estudiats ens agradaria detenir-nos un moment per a plantejar-ne la importància.

A continuació, passarem a exposar algun dels treballs existents en la bibliografia que relacionen l'exercici físic amb la protecció miocàrdica.

Així, Billman *et al.* (1984) en estudis de caràcter experimental, va demostrar l'efecte protector de la pràctica d'exercici físic regular sobre l'aparició d'arítmies. També s'han estat realitzats treballs de caràcter clínic que apunten en la mateixa direcció. Aquests treballs van demostrar que la pràctica diària d'exercici físic podia prevenir la FV induïda per isquèmia aguda en gossos portadors d'infart de miocardi cicatritzat.

Altres autors van demostrar, en gossos normals i en gossos diabètics sotmesos a entrenament, un augment en el llinar fibril·latori (Bakth *et al.*, 1986).

En altres estudis sobre pacients amb una història prèvia d'infart de miocardi, i que van seguir un programa de

rehabilitació amb exercici físic, es van trobar reduccions significatives en la incidència de mort sobtada (Berlín i Colditz, 1990).

Altres investigadors van trobar una major dificultat per a produir FV induïda per la isquèmia en gossos que havien seguit protocols d'exercici físic, en contrast amb els animals control (Hull *et al.*, 1994). Així mateix, les investigacions anteriors també van mostrar un augment del llindar fibril·latori quan la FV es va voler induir elèctricament en els animals que havien realitzat exercici físic diàriament.

Així, Bartels *et al.* (1997) van trobar que la incidència de mort sobtada d'origen cardíac era major en individus amb menor nivell d'activitat física regular, que en aquells subjectes en què el nivell d'activitat física regular era major.

Altres observacions demostren una menor incidència de mort sobtada en pacients amb un bon nivell de *forma física* (Ekelund *et al.*, 1988), o que tenien una despesa energètica elevada per les característiques del seu treball físic. Paffenbarger i Hala (1975) i Hertzeanu *et al.* (1993) van trobar, en pacients que havien patit un infart de miocardi i que presentaven fraccions d'ejecció baixes, una reducció en la severitat i en la freqüència de les arítmies, després de ser sotmesos a un programa d'entrenament.

Finalment, Billman (2002) va demostrar que l'exercici físic protegeix enfront de la mort sobtada d'origen cardíac.

Els resultats obtinguts en la present tesi com s'ha descrit detingudament en els apartats anteriors reafirmen els suggeriments d'estudis previs en què es presenta a l'entrenament físic com un mecanisme protector contra l'aparició de possibles arítmies per reentrada.

L'interés especial del present estudi resideix en les noves aportacions que es realitzen a la bibliografia dels efectes protectors de l'entrenament físic sobre el cor com són la disminució de la freqüència dominant mitjana de la FV, l'augment de la longitud d'ona del procés d'activació i la confirmació de l'augment de la refractarietat ventricular per l'entrenament. A més, concreta que el tipus d'entrenament físic aeròbic és el que resulta beneficiós o protector cardíac enfront de la mort sobtada d'origen ventricular, dins de d'amplíssim marc de l'exercici físic.

4.4. Limitacions metodològiques

No voldria finalitzar aquesta discussió sense plantejar algunes de les limitacions metodològiques amb què ens hem trobat després de la realització del present estudi.

Respecte al material de registre utilitzat, a pesar que considerem que és molt més adequat que l'utilitzat en estudis anteriors, hem d'assenyalar que l'adaptació entre el cor i la concavitat de l'elèctrode múltiple de registre, en alguns cors concrets no fou el més desitjable. Per això, seria interessant desenvolupar, en un futur, un sistema d'elèctrodes de registre més flexible i adaptable per complet a l'anatomia de cada cor, com per exemple una xarxa d'elèctrodes, encara que considerem que el seu desenvolupament seria tècnicament complex. En aquests moments el nostre grup de treball, en col·laboració amb el departament d'Electrònica de la Universitat Politècnica de València, està desenvolupant un sistema d'elèctrodes amb la idea de, gradualment, minimitzar aquesta limitació.

Encara que ja ha estat prou comentat, ací cap repetir que el fet que hi haja poques dades en el cas dels PRSCAV siga degut al fet que per a determinar el PRESCAV és necessari aplicar el test de l'extraestímul auricular, però, en quasi tots els casos on hem realitzat aquest test, s'ha aconseguit prèviament al PRSCAV el PRA, amb la qual cosa la determinació de la refractarietat del SCAV no hi ha estat possible. Aquesta limitació només seria superable amb un nombre molt elevat d'experiments, amb les implicacions tant ètiques com econòmiques que comportaria. D'altra banda, respecte a la determinació de la refractarietat del sistema de conducció AV cal dir que si s'haguera registrat el hisiograma, haguérem pogut determinar si les manques de captura en el SCAV, s'han

produït en el feix de His o en el node AV. No obstant, atès que durant el protocol experimental d'aquesta tesi no hem registrat els hisiogrames, haurem d'assumir que si es produeix un manca de captura de la conducció és nodal. Els hisiogrames no s'han realitzat perquè requereixen determinades maniobres metodològiques que no considerem adequades per a l'estudi present, com ara:

- 1) Obertura completa de l'aurícula dreta.

- 2) Inversió de temps, potser excessiu per no ser un objectiu, en la localització del feix de His (a vegades genera retards importants en el temps total de cada experiment).

- 3) La dificultat d'ubicació d'elèctrodes especials de localització de l'esmentat feix, junt amb l'elèctrode múltiple.

Respecte al sistema de perfusió de Langerdoff utilitzat en el present estudi experimental s'ha de comentar que, encara que és un bon model per a reproduir amb suficients garanties les condicions del cor *in vivo* per al seu perfecte funcionament i estudi (com així ho evidencia tota la bibliografia existent), es podrien aconseguir unes condicions més semblants a les fisiològiques que reconstruïren amb major exactitud les condicions reals de treball del miocardi. Açò, ho podríem aconseguir amb un sistema de perfusió de Langendorff però forçant al miocardi a realitzar treball (*Working Heart*). Efectivament, aquesta metodologia afegeix una nova variable

independent a l'estudi com seria el treball amb càrrega del cor. El nostre grup de treball ha començant una nova sèrie d'experiments amb aquesta tècnica, que consisteix en la introducció d'un catèter en el ventricle esquerre del cor una vegada ubicat al sistema de Langendorff. Aquest catèter té en el seu extrem distal un globus de làtex amb líquid en el seu interior graduable en cada experiment per a simular amb major exactitud la precàrrega del cor en condicions normals.

Respecte al procediment d'anàlisi utilitzat per a la tipificació de l'entrenament realitzat, encara que molt vàlid per al nostre objectiu inicial, ens deixa al mateix temps la incògnita de conèixer dins d'aquest tipus d'entrenament de resistència aeròbica, la càrrega de treball específica. És a dir, obri una nova via d'investigació, com per exemple la realització de diferents protocols d'entrenament amb el control del consum d'oxigen dels animals estudiats. Amb aquest objectiu el nostre grup investigador va demanar la corresponent ajuda de projectes d'investigació del Ministeri de Ciència i Tecnologia i actualment estem en procés d'implantar la tècnica.

No podem assegurar que els mecanismes subjacents en les modificacions electrofisiològiques obtingudes en la present tesi siguem degudes a mecanismes exclusivament intrínsecs miocàrdics. No obstant, interpretar els mecanismes per què se li atribueix a l'exercici físic un paper protector enfront de les arítmies, a través de la seua acció sobre el to vagal pot ser incomplet, ja que pel que fa a les funcions del sistema nerviós

cardíac (ganglis cardíacs), considerats predominantment parasimpàtics, hi ha una important incertesa. De fet, en l'actualitat, s'estan realitzant investigacions cabdals al respecte en l'actualitat (Johnson *et al.*, 2004). Diversos autors atorguen poca rellevància al control parasimpàtic vagal dels ventricles (Randall *et al.*, 1991), per una altra banda, hi ha investigacions més recents de les quals es pot desprendre que neurones del gangli craneoventricular de la superfície anterior del ventricle esquerre exercisquen efectes inotròpics negatius sobre aquest ventricle (Johnson *et al.*, 2004). A hores d'ara, la qüestió és per tant objecte de debat. Açò, ens ha encoratjat a sol·licitar una altra ajuda al Ministeri de Ciència i Tecnologia per a realitzar una nova sèrie d'experiments on es realitze un bloqueig dels receptors muscarínics miocàrdics amb l'administració d'atropina per a tractar de dilucidar l'efecte que les neurones postganglionars parasimpàtics pogueren tindre sobre les modificacions electrofisiològiques induïdes per l'exercici físic que presentem en la present tesi doctoral.

CAPÍTOL 5

Conclusions

Hem realitzat un estudi sobre els efectes de l'entrenament sobre les modificacions intrínseques de l'automatisme sinusal, la conducció AV, la velocitat de conducció ventricular, la refractarietat i la freqüència de la FV induïda en el miocardi ventricular del cor aïllat de conill. Així mateix, hem intentat tipificar l'entrenament realitzat en aquest model experimental.

Les conclusions que de tal estudi es poden extraure són:

Que l'entrenament en el nostre model experimental, produeix les següents modificacions intrínseques de les propietats electrofisiològiques estudiades.

1) Disminueix el cronotropisme sinusal i la conducció auriculoventricular i no modifica la velocitat de conducció ventricular.

2) Augmenta la refractarietat ventricular i la del sistema de conducció AV, mentre que no modifica la refractarietat auricular, ni la refractarietat del sistema de conducció ventriculoauricular.

3) Disminueix la freqüència dominant mitjana de la fibril·lació ventricular induïda encara que no modifica la freqüència dominant màxima ni la freqüència dominant mínima de la fibril·lació ventricular induïda.

4) Augmenta la longitud d'ona del procés d'activació ventricular.

5) Les dades de laboratori obtingudes són indicatives que el protocol d'entrenament utilitzat ha estat efectiu en el desenvolupament de modificacions tant electrofisiològiques com bioquímiques i a més, aquest entrenament s'ha desenvolupat en condicions aeròbiques.

6) Com a conclusió final, podem plantejar la possibilitat que l'entrenament aeròbic produïska efectes beneficiosos, a través de la modificació d'algunes propietats electrofisiològiques de caràcter intrínsec, per tant, no dependents de factors nerviosos extrínsecs i/o humorals, que probablement dificulten la instauració d'arítmies per reentrada. El present treball apunta cap a una possible ferramenta terapèutica no farmacològica i de prevenció de patologia miocàrdica, i planteja la necessitat de prosseguir amb aquestes investigacions.

CAPÍTOL 6

Referències bibliogràfiques

Abildskov JA. Additions to the wavelength hypothesis of cardiac fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5: 553-559, 1994.

Allessie MA, Konings K, Kirchhof CJHJ and Wijffels M. Electrophysiologic mechanisms of perpetuation of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 77: 10A-23A, 1996.

Anderson PA, Manring A, Sommer JR and Johnson EA. Cardiac muscle: an attempt to relate structure to function. *J Mol Cell Cardiol* 8(2):123-43, 1976.

Armour JA, Murphy DA, Yuan BX, Macdonald S and Hopkins DA. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec* 247: 289-298, 1997.

Astrand PO y Rodahl K. Fisiología del trabajo físico. 3ª edición. Panamerica. 1992.

Astrand PO, Rodahl K, Dahl HA and Stromme SB. Textbook of work physiology. Physiological bases of exercise. 4th ed. Human Kinetics. 2003.

Bakth S, Arena J, Remy WL, Hider B, Patel BC, Lyons MM and Regan TJ. Arrhythmia susceptibility and myocardial composition in diabetes: influence of physical conditioning. *J Clin Invest* 77: 382-395, 1986.

Bartels R, Menges M and Thimme W. Der einfluß von körperlicher aktivitat auf die inzidenz des plotzlichen herstodes. *Med Klin* 92: 319-325, 1997.

Bedford TG and Tipton CM. Exercise training and the arterial baroreflex. *J Appl Physiol* 63: 1926-1932, 1987.

Berlin JA and Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol* 1312: 612-628, 1990.

Billman GE, Schwartz PJ and Stone HL. The effects of daily exercise on susceptibility to sudden cardiac death. *Circulation* 69: 1182-1189, 1984.

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

Bjørnstad H, Storstein L, Meen HD and Hals O. Electrocardiographic findings of heart rate and conduction times in atheletic students and sedentary control subjects. *Cardiology* 83: 258-267, 1993a.

Bjørnstad H, Storstein L, Meen HD and Hals O. Electrocardiographic finding of left, right and septal hypertrophy in athletic students and sedentary control. *Cardiology* 82: 56-65, 1993b.

Bjørnstad H, Storstein L, Meen HD and Hals O. Ambulatory Electrocardiographic findings in top athletes, athletic students and control subjects. *Cardiology* 84: 42-50, 1994.

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

Blomqvist CG and Saltin B. Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann Rev Physiol* 63: 1926-1932, 1983.

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

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

Bowers RW and Fox EL. Fisiología del Deporte. 3º edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires. 1995.

Brorson L, Conrad Son TB, Olsson B and Varnauskas E. Right atrial monophasic action potential and effective refractory

periods in relation to physical training and maximal heart rate. *Cardiovasc Res* 10: 160-168, 1976.

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

Burton FL and Cobbe SM. Effect of sustained stretch on dispersion of ventricular fibrillation intervals in normal rabbit hearts. *Cardiovasc Res* 39:351-359, 1998.

Cabo C, Pertsov AM, Baxter WT, Davidenko JM, Gray RA and Jalife J. Wave-front curvature as a cause of slow conduction and block in isolated cardiac muscle. *Circ Res* 75: 1014-1028, 1994.

Cánoves J. Estudio experimental de la relación existente entre la longitud de onda del proceso de activación miocárdico y las características espectrales de la fibrilación ventricular. Tesis doctoral. Universitat de València. 2001.

Carlisle EJJ, Allen JD, Kernohan G, Leahey W and Adgey A. Pharmacological analysis of established ventricular fibrillation. *Br J Pharmacol* 100: 530-534, 1990.

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

Chorro FJ, Ruiz-Granell R, Casadan E, Garcia-Civera R, Such L and Lopez-Merino V. Mathematical descriptions of AV nodal function curves in dogs. *Pacing Clin Electrophysiol*. 11:679-1986, 1988.

Chorro FJ, Sánchez-Muñoz JJ, Sanchis J, Cortina J, Bataller M, Guerrero J, Espi J, Ruiperez JA and López-Merino V. Modifications in the evolution of the dominant frequency in ventricular fibrillation induced by amiodarone, diltiazem and flecainide. *J Electrocardiol* 29: 319-326, 1996.

Chorro FJ, Sanchis J, Such L, Artal L, Llavador JJ, Llavador E, Monmeneu JV and Lopez-Merino V. Modification of atrioventricular nodal electrophysiology by selective radiofrequency delivery on the anterior or posterior approaches. *Pacing Clin Electrophysiol* 20: 1261-1273, 1997.

Chorro FJ, Guerrero J, Cánoves J, Martínez-Sober M, Mainar L, Sanchis J, Calpe J, Llavador E, Espi J and López-Merino V. Quantification of the modifications in the dominant frequency of ventricular fibrillation under conditions of ischemia and reperfusion: An experimental study. *Pacing Clin Electrophysiol* 21: 1716-1723, 1998.

Chorro FJ, Mainar L, Sanchis J, Canoves J, Porres JC, Guerrero J, Millet J, Llavador E, Such LM, Egea S, Lopez-Merino V and Such L. The activation patterns during atrial fibrillation in an experimental model. *Rev Esp Cardiol* 52: 327-338, 1999.

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

Chorro FJ, Mainar L, Canoves J, Sanchis J, Such LM, Porres JC, Ferrero A, Cerdá M, Lopez Merino V and Such L. Characteristics of atrial electrograms recorded in radiofrequency induced block lines in an experimental model. *Rev Esp Cardiol* 53: 1596-1606, 2000b.

Chorro FJ, Trapero I, Guerrero J, Such LM, Canoves J, Mainar L, Ferrero A, Blasco E, Sanchis J, Millet J, Tormos A, Bodí V i Alberola A. Modification of ventricular fibrillation activation patterns induced by local stretching. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 16 (9):1-10, 2005.

Clusin WT, Buchbinder M, Elliis AK, Kernoff RS, Giacomini JC, and Harrison DC. Reduction of ischemic repolarization by the calcium channel blocker diltiazem. *Circ Res* 54: 10-20, 1984.

Currens JH and White PD. Half a century of running. *N Engl J Med* 265: 988-993, 1961.

Davidenko JM, Pertsov AV, Salomonsz JR, Baxter W and Jalife J. Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle. *Nature* 355: 349-351, 1992.

De Schryver C and Mertens-Strythagen J. Heart tissue acetylcholine in chronically exercised rats. *Experientia* 31: 316-318, 1975.

DiCarlo SE and Bishop VS. Exercise training enhances cardiac afferent inhibition of baroreflex function. *Am J Physiol* 258: 212-220, 1990.

Dillon SM, Allessie MA, Ursell PC and Wit AL. Influences of anisotropic tissue structure on reentrant circuits in the epicardial border zone of subacute canine infarcts. *Circ Res* 63: 182-206, 1988.

Doménech, E. Efecto de la administración de antioxidantes orales en las adaptaciones al ejercicio físico. Tesis doctoral. Universitat de València. 2006.

Dorian P and Newman D. Tedisamil increases coherence during ventricular fibrillation, and decreases defibrillation energy requirements. *Cardiovasc Res* 33: 485-494, 1997.

Downar E, Janse M and Durrer D. The effect of acute coronary artery occlusion on subepicardial transmembrane potentials in the intact porcine heart. *Circulation* 56: 217-224, 1977.

Duclohier H. Neuronal sodium channels in ventricular heart cells are localized near T-tubules openings. *Biochem Biophys Res Commun* 9; 334 (4):1135-1140, 2005.

Dudley GA, Abraham WM and Terjung RL. Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 53: 844-850, 1982.

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

Eggenreich U, Fleischmann PH, Stark G and Wach P. Effects of propafenone on the median frequency of ventricular fibrillation in Langenforff perfused guinea-pig hearts. *Cardiovasc Res* 31: 926-931, 1996.

Ekelund L, Haskell W, Johnson J, Whaley F, Criqui M and Sheps D. Physical fitness as a predictor of cardiovascular mortality in asymptomatic north american men. *N Engl J Med* 319: 1379-1384, 1988.

Eliakim A, Brasel JA, Mohan S, Barstow TJ, Berman N and Cooper DM. Physical Fitness, Endurance Training, and the Growth Hormone-Insulin-Like Growth Factor I System in Adolescent Females. *J Clin Endocrinol Metab* 81(11): 3986-3992, 1996.

Eliakim A, Brasel JA, Mohan S, Wong WLT and Cooper DM. Increased physical activity and the growth hormone-IGF-I axis in adolescent males. *Am J Physiol* 275 (1 Pt 2): R308-314, 1998.

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

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

Ferrero, JA. Cuantificación del fenómeno de fatiga en el nodo auriculoventricular del perro. Tesis doctoral. Universitat de València. 1990.

Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R, Fleg J, Froelicher VF, Leon AS, Piña IL, Rodney R, Simons-Morton DG, Williams MA and Bazzarre T. Exercise Standards

for Testing and Training. A Statement for Healthcare Professionals. *Circulation* 104: 1694-1740, 2001.

Furlan R, Piazza S, Dell'Orto S, Gentile E, Cerutti S, Massimo P and Malliani A. Early and late effects of exercise and athletic training on neural mechanisms controlling heart rate. *Cardiovasc Res* 27: 482-488, 1993.

García Manso JM, Navarro Valdivieso M i Ruiz Caballero JA. Bases teóricas del entrenamiento deportivo. Principios y aplicaciones. Gymnos Editorial. Madrid. 285-286, 1996.

Gazmuri RJ, Ayoub IM, Hoffner E and Kolarova JD. Successful Ventricular Defibrillation by the Selective Sodium-Hydrogen Exchanger Isoform-1 Inhibitor Cariporide. *Circulation* 104: 234-239, 2001.

Gómez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, and Vina J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567: 113-120, 2005.

González, J. Fisiología de la actividad física y el deporte. Ed Interamericana Mc Graw Hill. Madrid. 1992.

Gray RA, Pertsov AM and Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. *Nature* 392: 75-78, 1998.

Gray RA. What exactly are optically recorded "Action potentials"? *J Cardiovasc Electrophysiol* 10: 1463-1465, 1999.

Guyton AC y Hall JE. Tratado de Fisiología Médica. McGraw-Hill. 10ª ed. Madrid. 2001.

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

Hackney A, Sinning W and Bruot B. Reproductive hormonal profiles of endurance-trained and untrained males. *Med Sci Sports Exerc* 20: 60-65, 1988.

Hajnal A, Nagy O, Litvai A, Papp J, Parrat JR and Végh A. Nitric oxide involvement in the delayed antiarrhythmic effect of treadmill exercise in dogs. *Life sciences* 77: 1960-1971, 2005.

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

Harrison TR i Wilson JD. Harrison, principios de medicina interna. Interamericana. 8ª ed. Madrid. 1991.

Hartley LH, Grimby G, Kilbom A, Nilsson NJ, Astrand I, Bjure J, Ekblom B and Saltin B. Physical training in sedentary middle-

aged and older men: cardiac output and gas exchange during submaximal and maximal exercise. *Scand J Clin Lab Invest* 24: 335-344, 1969.

Haufe V, Chamberland C and Dumaine R. The promiscuous nature of the cardiac sodium current. *J Mol Cell Cardiol* 42 (3): 469-477, 2007.

Hertzeanu HL, Shermesh J and Aron LA. Ventricular arrhythmias in rehabilitated and nonrehabilitated postmyocardial infarction patients with left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol* 71: 24-27, 1993.

Hespel P, Lijnen P, VanHoof R, Fagard R, Goossens W, Lissens W, Moerman E and Amery A. Effects of physical endurance training on the plasma renin-angiotensin-aldosterone system in normal man. *J Endocrinol* 116: 443-449, 1988.

Hillsley RE, Wharton JM and Cates AW. Why do some patients have high defibrillation thresholds at defibrillation implantation? *PACE* 17: 222-39, 1994.

Himmel H, Wettwer E, Li Q and Ravens U. Four different components contribute to outward current in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 277: H107- H118, 1999.

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

Husain K and Hazelrigg SR. Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *Biochim Biophys Acta* 21; 1587 (1):75-82, 2002.

Jalife J, Delmar M, Davidenko J and Anumonwo J. Basic cardiac electrophysiology for the clinician. Futura publishing company. New York. 1999.

James TN and Spence CA. Distribution of cholinesterase within the sinus node and AV node of the human heart. *Anat Rec* 155: 151-62, 1966.

James D, Kraegen E and Chisholm D. Effects of exercise training on in vivo insulin action in individual tissues of the rat. *J Clin Invest* 76: 657-666, 1985.

Jew KN, Charlotte M, Mokolke A, Palmer M and Moore L. Endurance training alters outward K⁺ current characteristics in rat cardiocytes. *J Appl Physiol* 90: 1327-1333, 2001.

Jinbo Y, Kobaashi Y, Miyata A, Chiyoda K, Nakagawa H, Tanno K, Kurano K, Kidushima S, Baba T and Katagiri T. Decreasing parasympathetic tone activity and proarrhythmic effect alter

radiofrequency catheter ablation, differences in ablation site. *Jpn Circ J* Oct 62(10): 733-40, 1998.

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

Jones DL and Klein GJ. Ventricular fibrillation: the importance of being coarse?. *J Electrocardiol* 7: 393-399, 1984.

Katona PG, McLean M, Dighton DH and Guz A. Sympathetic and parasympathetic cardiac control in athletes and non-athletes at rest. *J Appl Physiol* 52: 1652-1657, 1982.

Kjaer M, Farrell P, Christensen N and Galbo H. Increased epinephrine response and inaccurate glucoregulation in exercising athletes. *J Appl Physiol* 61: 1693-1700, 1986.

Kléber A and Rudy Y. Basic mechanism of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol rev* 84: 431-488, 2004.

Kwan YY, Fan W, Hough D, Lee JJ, Fishbein MC, Karagueuzian HS and Chen PS. Effects of procainamide on

wave-front dynamics during ventricular fibrillation in open-chest dogs. *Circulation* 97: 1828-1836, 1998.

Lamb DR. Fisiología del Ejercicio. Respuestas y adaptaciones 2º Ed. Augusto E. Pila Teleña. Madrid. 1989.

Lammers WJE, Allesie MA and Bonke FIM. Reentrant and focal arrhythmias in low potassium in isolated rabbit atrium. *Am J Physiol*; 255:1359-1369, 1988.

Laughlin MH. Effects of exercise training on coronary circulation: introduction. *Med Sci Sport Exerc* 26: 1226-1229, 1994.

Lee JJ, Kamjoo K, Hough D, Hwang C, Fan W, Fishbein MC, Bonometti C, Ikeda T, Karagueuzian HS and Chen PS. Reentrant wave fronts in Wiggers' stage II ventricular fibrillation. Characteristics and mechanisms of termination and spontaneous regeneration. *Circ Res* 78: 660-675, 1996.

Lei M, Zhang H, Grace AA and Huang CLH. SCN5A and sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovasc Res* 74:356-365, 2007.

Levy MN, Koeppen BM i Stanton BA. Berne y Levy. Fisiología. Ed. Elsevier. Madrid. 2006.

Levy MN and Zieske H. Autonomic control of cardiac pacemaker activity and atrioventricular transmission. *J Appl Physiol* 27: 465-70, 1969.

Lewis SF, Nylander E, Gad P and Areskog N. Non- autonomic component in bradycardia of endurance trained men at rest and during exercise. *Acta Physiol Scand* 109: 297- 305, 1980.

Liu L and Nattel S. Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol* 273: H805-H816, 1997.

López-Chicharro J i Fernández A. Fisiología del ejercicio. Ed Panamericana. Madrid. 2001.

López L, Benítez J, Trapero I, Chorro FJ, Such L, Gómez MC and Alberola A. Effects of physical training on the intrinsic atrial refractoriness. *J Physiol Biochem*, 61 (1), 295, 2005a.

López L, Such LM, Trapero I, Benítez J, Alberola A, Such L, San Valero E and Chorro FJ. Physical training produces intrinsic modifications on the electrophysiological properties of ventricular myocardium. An experimental study. *J Physiol Biochem* 61: 102, 2005b.

Mace L, Palmer B, Brown D, Jew K, Lynch J, Glunt J, Parsons T, Cheung J and Moore R. Influence of age and run training on

cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *J Appl Physiol* 95: 1994-2003, 2003.

Marr-Pernat A, Weil MH and Tang W. Optimizing timing of ventricular fibrillation. *Crit Care Med* 29: 2360-2365, 2001.

Martin G, Cosín J, and Such M. The evaluation of ECG power spectrum during ventricular fibrillation. *Eur Heart J* 5: 356-363, 1984.

Martin G, Cosín J, Such M, Hernández A and Llamas P. Relation between power spectrum time course during ventricular fibrillation and electromechanical dissociation.

Effects of coronary perfusion and nifedipine. *Eur Heart J* 560-569, 1986.

Martin JE, Dubbert PM and Cushman WC. Controlled Trial of Aerobic Exercise in Hypertension. *Circulation* 81: 1560-1567, 1990.

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

Moe GK, Harris S and Wiggers CJ. Analysis of the initiation of fibrillation by electrocardiographic studies. *Am J Physiol* 134: 473-487, 1941.

Moe GK. On the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 140: 183-188, 1962.

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

Moore R, Musch Timothy, Yelamarty R, Escaroto R, Semanchick A, Elensky M and Cheung J. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 264: C1180-C1189, 1993.

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

Mountcastle V. Fisiología Médica. 1ª ed. Fournier SA. Mexico. 2: 810-815.1974.

Mujika I, Hatard JC, Padilla S, Guezennec CY and Geysant A. Hormonal responses to training and its tapering off in

competitive swimmers: relationships with performance. *Eur J Appl Physiol* 74(4): 361-366, 1996.

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

Nazir SA, Lab MJ. Mechanoelectric feedback and atrial arrhythmias. *Cardiovasc. Res*: 32:52-61, 1996.

Northcote RJ, Gordon PC and Ballantyne D. Electrocardiographic findings in male veteran endurance athletes. *Br Heart J* 61: 155-160, 1989.

Nylander E, Sigvardsson K and Kilbom A. Training-induced bradycardia and intrinsic heart rate in rats. *Eur J Appl Physiol* 48: 189-199, 1982.

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

Ordway GA, Charles JB, Randall DC, Billman GE and Wekstein DR. Heart rate adaptation to exercise training in cardiac-denervated dogs. *J Appl Physiol* 52: 1586-1590, 1982.

Paffenbarger R and Hale W. Work activity and coronary heart mortality. *N Engl J Med* 292: 545-550, 1975.

Palatini P, Marablino G, Sperti G, Calzavara A, Libardoni M, Pessina AC and Dal Palu C. Prevalence and possible mechanisms of ventricular arrhythmias in athletes. *Am Heart J* 110: 560-567, 1985.

Pauza DH, Skripa V, Pauziene N and Stropus R. Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart. *Anat Rec* 1;259(4): 353-82, 2000.

Pelliccia A, Maron BJ, Spataro A, Proschan MA and Spirito P. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *N Eng J Med* 324: 295-301, 1991.

Pertsov AM, Davidenko JM, Salomonsz R, Baxter WT and Jalife J. Spiral waves of excitation underlie reentrant activity in isolated cardiac muscle. *Circ Res* 72: 631-650, 1993.

Powers SC, Locke M and Demirel HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exec* 33:386-392, 2001.

Prystowsky JN, Jackman WM, Rickenberger RL, Heger JJ, and Zipes DP. Effect of autonomic blockade on ventricular refractoriness and atrioventricular nodal conduction in humans: evidence supporting a direct cholinergic action on ventricular muscle refractoriness. *Circ Res* 49: 511-18, 1981.

Randall WC, Randall DC, and Ardell JL. Autonomic regulation of myocardial contractility. In: *Reflex Control of the Circulation*, edited by Zucker IH and Gilmore JP. Boston, MA: CRC, p. 39-65, 1991.

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

Roden D, Balsler J, George A and Anderson M. *Ann Rev of Physiol* 64: 431-475, 2002.

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

Ropella KM. Frequency domain analysis of endocardial signals. *Ann Ist Super Sanita* 3: 351-359, 2001.

Saffitz JE, Kanter HL, Green KG, Tolley TK and Beyer EC. Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium. *Circ Res* 74(6):1065-1070,1994.

Saltin B, Blomqvist G, Mitchell JH, Johnson RL, Wildenthal K and Chapman CB. Response to exercise after bed rest and after training. *Circulation* 38: 78-84, 1968.

Schaible T and Scheuer J. Cardiac adaptations to chronic exercise. *Progress in cardiovascular diseases* 27: 297-324, 1985.

Scheuer J and Tipton, CM. Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann Rev Physiol* 39: 221-251, 1997.

Schmid PT, Grief BJ, Lund DD and Roskoski R. Regional choline acetyltransferase activity in guinea pig heart. *Cir Res* 42: 657-60, 1978.

Seals DR and Chase PB. Influence of physical training on HR variability and baroreflex circulatory control. *J Appl Physiol* 66: 1886-1895, 1989.

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

Shipsey SJ, Bryant SM and Hart G. Effects of hypertrophy on regional action potential characteristics in the rat left ventricle: a cellular basis for T-wave inversion? *Circulation*. 16;96 (6):2061-2068, 1997.

Spear JF and Moore EN. Influence of brief vagal and stellate nerve stimulation on pacemaker activity and conduction within

the atrioventricular conduction system of the dog. *Circ Res* 32: 27-41, 1973.

Stein RA, Michielli D, Fox EL and Krasnow N. Continuous ventricular dimensions in man during supine exercise and recovery. An echocardiographic study. *Am J Cardiol* 41(4):655-660, 1978.

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

Stewart AJ, Allen JD, Devine AB and Adgey AAJ. Effects of blockade of fast and slow inward current channels on ventricular fibrillation in the pig heart. *Heart* 76: 513-519, 1996.

Strohmenger HU, Lindner KH and Brown CG. Analysis of the ventricular fibrillation ECG signal amplitude and frequency parameters as predictors of countershock success in humans. *Chest* 111: 584-89, 1997.

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

Such LM, López L, Benítez J, Trapero I, Chorro FJ, Such L, Gómez MC and Alberola A. Effects of physical training on the intrinsic atrial refractoriness. *J Physiol Biochem* 61: 295, 2005.

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

Such-Miquel, L. 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. 2005.

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

Swartz JF, Jones JL and Fletcher RD. Characterization of ventricular fibrillation based on monophasic action potential morphology in the human heart. *Circulation* 87: 1907-1914, 1993.

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

Tcheng KT. Innervation of the dog's heart. *Am Heart J* 41:512-24, 1951.

Tepperman J and Pearlman D. Effects of exercise and anemia on coronary arteries of small animals as revealed by the corrosion-cast technique. *Circ Res* 9: 576-584, 1961.

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

Tipton CM, Matthes RD, Tcheng T, Dowell RT and Vailas AC. The use of Langendorff preparation to study the bradycardia of training. *Med Sci Sports* 9: 220-230, 1977.

Tormos, A. Estudio experimental de los efectos de la hipotermia y la hipertermia local sobre los parámetros electrofisiológicos del miocardio y la frecuencia de activación de la fibrilación ventricular. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València. 2005.

Vanoli E, De Ferrari GM, Stramba-Badiale M, Foreman RD and Schwartz PJ. Vagal stimulation and prevention of sudden death

in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res* 68: 1471-81, 1991.

Viitasalo MT, Kala R and Eisalo A. Ambulatory electrocardiographic recording in endurance athletes. *Br Heart J* 47: 213-220, 1982.

Viitasalo MT, Kala R and Eisalo A. Ambulatory electrocardiographic findings in young athletes between 14-16 years of age. *Eur Heart J* 5: 2-6, 1984.

Voltarell FA, Gobatto CA and Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35: 1389-1394, 2002.

Warner MR and Zipes DP. Vagal control of myocardial refractoriness. In: *Vagal Control of the Heart: Experimental Basis and Clinical Implications*, edited by Levy MN and Schwartz PJ. Armonk, NY: Futura 261-276, 1994.

Weaver VY, Cobb LA, Dennis D, Roberta R, Alfred HP and Copass CK. Amplitude of ventricular fibrillation waveform and outcome after cardiac arrest *Ann Intern Med* 102: 53-55, 1985.

Wei J, Spurgeon H and Lakatta E. Excitation-contraction in rat myocardium: alterations with adult aging. *Am J Physiol* 246: H784-H791, 1984.

Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Qu Z and Chen PS. Chaos and the transition to ventricular fibrillation. A new approach to antiarrhythmic drug evaluation. *Circulation* 99: 2819-2826, 1999.

West. Bases fisiológicas de la práctica médica. 12^a edición. Ed. Médica Panamericana. 1998.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R and Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 92: 1984-1968,1995.

Wirth A, Diehm C, Mayer H, Mörl H and Vogel I. Plasma C-peptide and insulin in trained and untrained subjects. *J Appl Physiol* 50: 71-77, 1981.

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

Zaitsev A, Guha P, Sarmast F, Kolli A, Berenfeld O, Pertsov A, Groot J, Coronel R and Jalife J. Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circ Res* 92: 546-553, 2003.

Zhou X, Ideker RE, Blitchington TF, Smith WM and Knisley SB. Optical transmembrane potential measurements during

defibrillation-strength shocks in perfused rabbit hearts. *Circ Res* 77: 593-602, 1995.

Zipes DP. Electrophysiological mechanisms involved in ventricular fibrillation. *Circulation* 52: 120-30, 1975.

Zipes DP i Jalife J. Arritmias. Electrofisiología cardíaca. Marban. 1ª Edición. Madrid. 2006.

Zipes DP, Libby P, Bonow RO and Braunwald E. Braunwald's.Heart disease. A textbook of cardiovascular Medicine. Elsevier Sauneders. 7th Edition. Philadelphia. 2005.