



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA
Departament de Fisiologia

**Estudio de la participación de las neuronas
colinérgicas miocárdicas sobre las modificaciones
que el ejercicio físico crónico produce en la
activación eléctrica y parámetros asociados,
durante la fibrilación ventricular.**

Tesis Doctoral presentada por:
Laia Brines Ferrando

Dirigida por:
Prof. Antonio Alberola Aguilar
Prof. Luis Such Miquel
Prof. Manuel Zarzoso Muñoz

Valencia, 2014

D. Antonio Alberola Aguilar, Doctor por la Universitat de València (E. G.) y Catedrático Universitario en el Departamento de Fisiología de la Universitat de València (E. G.), **D. Luis Such Miquel**, Doctor por la Universitat de València (E. G.) y profesor del departamento de Fisioterapia de la Universitat de València (E. G.) y **D. Manuel Zarzoso Muñoz**, Doctor por la Universitat de València (E. G.) y profesor del departamento de Fisioterapia de la Universitat de València (E. G.),

HACEN CONSTAR, que la presente Tesis Doctoral titulada: **“Estudio de la participación de las neuronas colinérgicas miocárdicas sobre las modificaciones que el ejercicio físico crónico produce en la activación eléctrica y parámetros asociados, durante la fibrilación ventricular”**, cuyo autor es D^a Laia Brines Ferrando, ha sido realizada bajo su dirección y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para que pueda optar al grado de Doctor.

Valencia, julio de 2014

D. Antonio Alberola Aguilar D. Luis Such Miquel D. Manuel Zarzoso Muñoz

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del plan nacional de I+D+I, con una ayuda otorgada a Antonio Alberola Aguilar (DEP2007-73234-C03-01).

Agraïments

El meu profund agraïment als meus companys i amics amb els quals tinc el gran luxe de treballar i compartir les inquietuds i il·lusions en els projectes encetats. Igualment m'agradaria expressar la meua gratitud envers els directors d'aquest treball que m'han guiat en el camí i, naturalment, als meus caps. Aquest treball no s'hauria pogut portar endavant sense la generosa ajuda d'aquestes persones que han compartit els seus coneixements i la seua experiència. A tots vosaltres, faig extensiu el meu sincer agraïment.

Al meu marit, per la paciència, amor, amistat i bona predisposició per preparar-me bons menjars. A la meua família pel seu recolzament incondicional.

I també al meu futur fill, per permetre'm començar a sentir la classe d'amor pel què la gent es torna boja sense dubtar-ho. Així com per donar-me forces, ànims i desitjos per finalitzar aquesta tesi.

Abreviaturas

ACh: acetilcolina

AMPc: adenosín-5'-monofosfato cíclico

ATP: adenosín-5'-trifosfato

AV: auriculoventricular

CA: complejidad de activación

CV: coeficiente de variación

dV/dt: derivada del voltaje respecto al tiempo

ECG: señal del electrocardiograma

FA: fibrilación auricular

FV: fibrilación ventricular

G_i: proteína G inhibitoria

GMP_c: guanosín monofosfato cíclico

G_q: proteína G estimulante

HSP60: proteína de choque térmico 60

I_{Ca-L}: corriente de Ca²⁺ de larga duración

I_f: corriente marcapasos

I_f: corriente marcapasos

I_{K1}: corriente rectificadora interna

I_{KACH}: corriente de K⁺ sensible a la acetilcolina

I_{Kr} : corriente rectificadora tardía, rápida

I_{Ks} : corriente rectificadora tardía, lenta

I_{Kur} : corriente rectificadora tardía, ultrarrápida

$I_{Na/K}$: corriente iónica generada por el intercambiador Na^+/K^+

I_{Na} : corriente rápida de entrada de Na^+

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

I_{to} : corriente transitoria de salida de K^+

M: muscarínico

PA: potencial de acción

PRA: periodo refractario absoluto

PRE: periodo refractario efectivo

PRF: periodo refractario funcional

PRF: periodo refractario funcional

PRR: periodo refractario relativo

PRT: periodo de recuperación total

PSN: periodo supernormal

SA: sinoauricular

SNA: sistema nervioso autónomo

TV: taquicardia ventricular

VO_{2max} : consumo máximo de oxígeno

VV: intervalo de activación

Índice

Capítulo 1. Introducción	7
1.1 Objetivos	9
1.2 Justificación de los objetivos	10
1.2.1 Efectos del entrenamiento físico	10
1.2.1.1 Manifestaciones generales de la práctica regular de ejercicio físico	11
1.2.1.2 Manifestaciones del ejercicio físico sobre el corazón	13
1.2.1.2.1 Generales	13
1.2.1.2.2 Electrofisiológicas	17
1.2.2 El sistema nervioso autónomo (SNA)	24
1.2.2.1 Generalidades	24
1.2.2.2 El SNA en el corazón	27
1.2.2.2.1 El sistema nervioso extrínseco.....	28
1.2.2.2.2 Sistema nervioso intrínseco	35
1.2.2.3 Neurotransmisión colinérgica. Bloqueo de la misma	39
1.2.2.4 Efectos del SNA sobre la electrofisiología cardíaca.....	42
1.2.2.4.1 Automatismo sinusal.....	43
1.2.2.4.2 Conducción	48
1.2.2.4.3 Refractariedad.....	50
1.2.2.4.4 Alteraciones de la función eléctrica cardíaca.....	58
1.2.3 Consideraciones sobre el uso del análisis de la fibrilación ventricular para el estudio de las propiedades electrofisiológicas miocárdicas	61
1.2.3.1 Generalidades de la fibrilación ventricular.....	61

1.2.3.2 Métodos de análisis de la fibrilación ventricular. Estudio de otros parámetros electrofisiológicos	65
1.3 Resumen de la justificación de los objetivos e hipótesis de trabajo.....	69
1.4 Plan de trabajo	70
Capítulo 2. Material y métodos	73
2.1 Material.....	75
2.1.1 Animales de experimentación: características.....	75
2.1.2 Reactivos	75
2.1.3 Dispositivos	76
2.1.3.1 Para pesaje	76
2.1.3.2 Para entrenamiento	76
2.1.3.3 Otros	76
2.1.4 Sistemas y programas informáticos.....	78
2.1.4.1 Sistema de perfusión del corazón	78
2.1.4.2 Sistema de registro.....	79
2.1.4.3 Sistema de estimulación	81
2.1.4.4 Programas informáticos.....	82
2.2 Métodos.....	85
2.2.1 Preparación y acondicionamiento de los animales.....	85
2.2.1.1 Estabulación.....	85
2.2.1.2 Protocolo de familiarización (grupos de estudio)	86
2.2.1.3 Protocolo de entrenamiento físico	87
2.2.2 Preparación experimental	88
2.2.3 Protocolo experimental	92
2.2.4 Parámetros electrofisiológicos analizados.....	95

2.2.5 Análisis estadístico.....	102
2.2.6 Legislación	102
Capítulo 3. Resultados.....	103
3.1 Inducción de la FV.....	105
3.2 Análisis de la FV en el dominio del tiempo.....	106
3.2.1 Intervalos VV.....	106
3.2.1.1 Efecto del entrenamiento físico	106
3.2.1.2 Efecto del bloqueo colinérgico	107
3.2.1.3 Resultados en el grupo falso operado	108
3.3 Parámetros electrofisiológicos durante la FV	109
3.3.1 Periodo refractario funcional (PRF)	109
3.3.1.1 Efecto del entrenamiento físico	109
3.3.1.2 Efecto del bloqueo colinérgico	109
3.3.1.3 Resultados en el grupo falso operado	110
3.3.2 Coeficiente de variación del PRF.....	111
3.3.2.1 Efecto del entrenamiento físico	111
3.3.2.2 Efecto del bloqueo colinérgico	111
3.3.2.3 Resultados en el grupo falso operado	112
3.3.3 Tiempos de activación.....	113
3.3.3.1 Efecto del entrenamiento físico	113
3.3.3.2 Efecto del bloqueo colinérgico	114
3.3.3.3 Resultados en el grupo falso operado	115
3.4 Análisis de los mapas de activación miocárdica.....	115
3.4.1 Complejidad global de la activación.....	115
3.4.1.1 Efecto del entrenamiento físico	115
3.4.1.2 Efecto del bloqueo colinérgico	116

3.4.2 Grados específicos de complejidad de activación	117
3.4.2.1 Efecto del entrenamiento físico	117
3.4.2.2 Efecto del bloqueo colinérgico	120
3.5 Flujo coronario	122
3.6 Peso de los corazones	123
Capítulo 4. Discusión	125
4.1 Consideraciones generales	127
4.2 Consideraciones sobre la metodología empleada	128
4.2.1 Respecto al modelo animal	130
4.2.2 Respecto a la preparación experimental	133
4.2.3 Respecto al fármaco de elección.....	134
4.2.4 Respecto al protocolo de entrenamiento físico.....	135
4.3 Consideraciones sobre los resultados obtenidos	138
4.3.1 Inducibilidad de la FV	138
4.3.2 Intervalos VV	139
4.3.3 Refractariedad.....	140
4.3.4 Heterogeneidad eléctrica miocárdica	143
4.3.5 Complejidad de la activación eléctrica miocárdica.....	144
4.3.6 Tiempo de activación	146
4.4 Consideraciones finales respecto a los resultados	148
4.5 Limitaciones del estudio	150
Capítulo 5. Conclusiones	153
Capítulo 6. Referencias bibliográficas	157

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Objetivos.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es investigar en un modelo de corazón aislado de conejo normalmente perfundido y en fibrilación ventricular, las modificaciones electrofisiológicas que el ejercicio físico regular produce sobre determinados parámetros electrofisiológicos y la posible participación del sistema nervioso parasimpático intracardiaco en dichas modificaciones.

Para cumplir este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Confirmar si la realización de ejercicio físico crónico produce un incremento en la refractariedad ventricular también observable durante la fibrilación ventricular.
- 2) Determinar los efectos del entrenamiento físico sobre la frecuencia de aparición de complejos de activación ventriculares durante la fibrilación ventricular.
- 3) Estudiar si la heterogeneidad del tejido miocárdico es modificada por la realización de ejercicio físico crónico.
- 4) Determinar si la realización de ejercicio físico crónico reduce la complejidad eléctrica miocárdica global sobre la base de variaciones de diferentes patrones de activación.
- 5) Determinar si los tiempos de activación ventriculares durante la fibrilación ventricular se modifican después de la aplicación de un protocolo de ejercicio físico crónico.

6) Comprobar si el entrenamiento físico puede resultar un elemento protector frente a la susceptibilidad miocárdica de sufrir una fibrilación ventricular.

7) Estudiar la participación de las neuronas miocárdicas colinérgicas sobre las posibles modificaciones inducidas por el ejercicio físico crónico sobre los parámetros electrofisiológicos antes citados.

1.2 Justificación de los objetivos.

1.2.1 Efectos del entrenamiento físico.

Es conocido que el entrenamiento físico tiene efectos beneficiosos sobre la salud, aparte de los aspectos puramente competitivos y lúdicos.

Se conoce desde la edad antigua muchos de estos efectos en donde se encuentran numerosos aforismos sobre los beneficios del movimiento a modo de terapia como mejora del funcionamiento corporal. Ya en los bajorrelieves persas y egipcios se ven representados los masajes, la gimnasia y los baños asociándolos con la terapéutica del movimiento.

Pero los orígenes de las leyes del funcionamiento en las que se basa el ejercicio físico no aparecerán hasta el periodo helenístico donde, aparte de las hipótesis formuladas sobre el funcionamiento neuromuscular (Aristóteles -384-322 a.C.- describió por primera vez las acciones de los músculos y Galeno -época romana- el que relacionó aferentes y eferentes neuromusculares, así como músculos agonistas y antagonistas) será considerado el ejercicio como medio de salud. En resumen, en el mundo grecomediterráneo va a ser concebido el ejercicio físico como elemento de armonía y por tanto proyectado a la mejora del índice de salud y bienestar (Chicharro, 2006). Este pensamiento llega hasta nuestros días.

1.2.1.1 Manifestaciones generales de la práctica regular de ejercicio físico.

Todo el conjunto de adaptaciones fisiológicas, entre ellas las respiratorias, cardiovasculares y otros cambios metabólicos, que acontecen durante el ejercicio tienen como meta común ofrecer a los músculos estriados en actividad un aporte de oxígeno adecuado, de modo que el "aparato" contráctil pueda funcionar por mucho tiempo. En este apartado, abordaremos un breve resumen de algunas adaptaciones no cardíacas que produce el ejercicio físico.

Por una parte comentaremos los cambios bioquímicos que permiten una mayor producción energética y una mayor eliminación de los productos de desecho. Dentro de los cambios aeróbicos, podemos enumerar las tres principales adaptaciones que se producen en el músculo esquelético: 1) aumento del contenido de mioglobina, 2) aumento de la tasa de oxidación de hidratos de carbono, 3) incremento en la oxidación de las grasas y como consecuencia de estas tres anteriores podemos añadir una disminución en la producción de ácido láctico. En relación con los cambios anaeróbicos, primero decir que tienen menor importancia a nivel global ya que son más específicos de actividades deportivas con un alto componente anaeróbico. Enumeraremos también tres cambios importantes: 1) incremento de la capacidad del sistema de fosfágenos (ATP/PC), 2) aumento de la capacidad glucolítica y 3) aumento de la producción de lactato (Chicharro, 2006).

También se producen cambios, vasculares, de los que podemos destacar los cambios en la microcirculación. Efectivamente, la microcirculación sufre cambios notables. Durante el reposo, sólo el 12-20% aproximadamente de los capilares musculares (que llevan sangre al músculo) están abiertos. Pero durante el ejercicio intenso, la inmensa mayoría de los capilares, se han

abierto. Algo similar ocurre en la microcirculación miocárdica como luego destacaremos. Es esta apertura de los capilares inactivos la mayor responsable del aumento del flujo sanguíneo. En el individuo entrenado el volumen sanguíneo muscular está reducido para una determinada carga de trabajo. Esto ocurre porque existe una mayor extracción de oxígeno en el músculo entrenado y no necesita mucho flujo, todo ello posibilitado por el aumento de las enzimas mitocondriales oxidativas y por el número y tamaño de las mitocondrias. También encontramos cambios en el volumen sanguíneo y en la concentración de hemoglobina. En relación con los cambios en la presión arterial, comentar que en reposo, los valores de presión se reducen con el entrenamiento, especialmente en aquellos individuos con una presión arterial en el límite de la normalidad o elevada.

Otra serie de efectos que el ejercicio físico realizado con asiduidad es capaz de generar en nuestro organismo, son cambios en la composición corporal y el somatotipo, cambios en los niveles de colesterol y triglicéridos, los importantes cambios en el metabolismo de la glucosa y cambios a nivel del tejido conjuntivo.

Por último y no menos importante (da base a nuestro estudio), es el efecto que el ejercicio físico realizado de forma continuada produce en el sistema nervioso autónomo. Es ampliamente conocido que el equilibrio del sistema nervioso vegetativo es modificado por la actividad física de resistencia, en el sentido de aumentar el tono parasimpático y disminuir el tono simpático, resultando este efecto un mecanismo de protección miocárdico. Además, podría explicar algunos mecanismos por los que el ejercicio genera cambios electrofisiológicos.

1.2.1.2 Manifestaciones del ejercicio físico sobre el corazón.

1.2.1.2.1 Generales.

El entrenamiento de resistencia aeróbica produce importantes modificaciones morfofuncionales en el corazón. Quizá una de las más conocidas sea el aumento de la masa miocárdica. Caracterizado por un aumento de la cavidad ventricular y un espesor normal de la pared ventricular, implicando un mayor volumen diastólico y consecuentemente un mayor volumen sistólico. Cuando el sujeto entrenado es sometido a un entrenamiento en actividades de potencia, se da hipertrofia caracterizada por una cavidad ventricular normal, y una pared ventricular más gruesa, sin diferir el volumen sistólico de una persona no entrenada.

Estas adaptaciones en las dimensiones cardiacas, han sido estudiadas por diferentes autores durante mediados del siglo XX, así, Schaible y Scheuer (1985), relataron que en atletas de resistencia se produjo un aumento del tamaño miocárdico junto con ciertos cambios electrocardiográficos y fonocardiográficos, de donde deriva el concepto del “síndrome del corazón del deportista”. Saltin y cols. (1968) vieron que estos cambios pueden ocurrir en cuestión de algunas semanas, pero el mantenimiento del aumento del tamaño cardíaco incluso después de cierto tiempo de relativa inactividad, requiere haberse entrenado intensivamente durante varios años, tal y como señalaron en una revisión al respecto Blomqvist y Saltin (1983). Según algunos autores, el entrenamiento de resistencia, ocasiona un aumento del volumen telediastólico sin cambios en el grosor de la pared ventricular, la cual sí aumentó de grosor con la realización de ejercicios isométricos, sin variaciones en el volumen ventricular izquierdo, como relataron Blomqvist y Saltin (1983). En posteriores estudios se relató que la realización de

ejercicios, tanto de tipo dinámico como isométrico, produjo un aumento de la masa total ventricular izquierda; pero el aumento de la masa normalizada respecto al peso corporal total o al peso magro total, solamente se produjo en los entrenamientos de resistencia (Blomqvist y Saltin, 1983). En estudios experimentales, se ha visto que al parecer hay una relación de proporcionalidad directa entre la magnitud de la hipertrofia y la duración del programa de entrenamiento, y de proporcionalidad inversa con la edad (Blomqvist y Saltin, 1983).

En cuanto a la hipertrofia que se produce, tampoco están claros los mecanismos que la producen en los atletas de resistencia, postulándose distintas causas como son: el aumento de la carga, el aumento del volumen, el aumento de la presión, o la prolongada estimulación por catecolaminas (Opie, 1998).

Por otro lado, un aumento de la masa miocárdica, más bien del diámetro externo o interno del corazón, podría ser el responsable de modificaciones electrofisiológicas, ya que aumentaría el trayecto que debería recorrer el impulso eléctrico facilitando en principio los mecanismos de reentrada (Panfilov, 2006).

Otra de las adaptaciones que produce el entrenamiento físico es sobre la circulación coronaria. Las adaptaciones vasculares coronarias permiten incrementar el aporte de oxígeno al miocardio cuando aumentan sus demandas, lo cual si bien no hay evidencia que sugiera que la cuantía de flujo coronario limita el metabolismo oxidativo en el corazón normal aun durante el ejercicio máximo, un aumento en el aporte de oxígeno miocárdico tras el entrenamiento físico podría actuar facilitando la máxima ejecución (*performance*) cardíaca (Duncker y Bache, 2008). Las adaptaciones

vasculares coronarias pueden ser estructurales (a nivel de arteriolas coronarias y capilares), relativas al control neurohumoral y a las adaptaciones al mismo.

Para ahondar más en el tema nos centraremos en las adaptaciones que el ejercicio físico produce en la microcirculación coronaria incluyendo el aumento de la densidad arteriolar y/o de los diámetros, que proporcionan una base morfométrica para el aumento de los porcentajes máximos de flujo sanguíneo coronario en animales entrenados. En animales grandes entrenados en cinta rodante, la formación de nuevos capilares mantiene la densidad a un nivel acorde con el grado de hipertrofia miocárdica inducida fisiológicamente por el ejercicio. No obstante, el entrenamiento modifica la distribución de la resistencia vascular coronaria de tal manera que son reclutados más capilares, resultando un incremento del producto del área de la superficie permeable, sin cambios en la densidad capilar. El mantenimiento del tono α y β adrenérgico en presencia de niveles bajos de catecolaminas circulantes parece ser debido a un aumento de la respuesta del receptor a la estimulación adrenérgica. El entrenamiento también altera el control local de la resistencia vascular coronaria. De ahí que las arteriolas exhiban un tono miogénico aumentado, debido a una alteración mediada por la señal calcio dependiente de la proteinquinasa C en la actividad del canal de calcio voltaje dependiente en respuesta al estiramiento. Contrariamente, el entrenamiento aumenta la vasodilatación dependiente del endotelio a través de la microcirculación coronaria. Esta respuesta activada parece resultar principalmente de una expresión aumentada de la óxido nítrico sintasa inducible. Resultados similares en cuanto al aumento de la óxido nítrico sintasa inducible así como del aumento de proteínas de choque térmico en

corazones de conejo sometido a entrenamiento ya fue publicado por nuestro grupo (Such, y cols., 2008). Finalmente, el condicionamiento físico disminuye las fuerzas compresivas extravasculares en reposo y a niveles equitativos de ejercicio principalmente por una disminución de la frecuencia cardíaca (Duncker y Bache, 2008), lo que produciría un mayor tiempo de diástole y como consecuencia un mayor tiempo para la entrada de sangre al lecho coronario durante la diástole, con la consiguiente mejora de la nutrición miocárdica.

Otra de las modificaciones manifiestas, como consecuencia en parte del aumento de la masa miocárdica en aquellas hipertrofias con aumento del volumen de las cámaras ventriculares, es el aumento del volumen sistólico. Ello, entre otros fue estudiado por Schaible y Scheuer (1985), estos autores atribuyeron este incremento al mecanismo descrito por Frank y Starling, ya que ha sido relatado que la realización de ejercicio físico produce aparte de un aumento de las cámaras cardíacas, un mayor tiempo de llenado ventricular (por disminución de la frecuencia cardíaca), lo que conlleva a un incremento del volumen telediastólico, mayor estiramiento de las paredes ventriculares y aumento de la fuerza de contracción. El aumento de llenado telediastólico también es favorecido durante la realización de ejercicio por el aumento del retorno venoso, pero este efecto no se manifiesta durante el reposo. Otros autores, como Pelliccia y cols. (1991) relataron resultados similares.

Otro mecanismo que se ha tratado de implicar en el aumento del volumen sistólico y que hemos acabado de comentar, es el aumento del estado inotrópico (contractilidad) del corazón en los individuos entrenados (Fletcher y cols., 2001). Pero la evidencia de un aumento de la contractilidad

en sujetos entrenados durante el ejercicio es algo contradictoria. Los estudios de Stein y cols. (1978) y Anholm y cols. (1982) (tomado de Schaible y Scheuer, 1985), mostraron un incremento en el acortamiento miocárdico en sujetos entrenados durante el ejercicio que puede haberse producido bajo condiciones de reposo. En 1982, un estudio de Bar-Shlomo y cols. (1982) (tomado de Schaible y Scheuer, 1985), no mostró diferencias en este acortamiento en reposo durante el ejercicio. Rerych y cols. (1978 tomado de Schaible y Scheuer, 1985) relataron una disminución del acortamiento en sujetos entrenados, en reposo, pero no mostraron diferencias durante el ejercicio. Curiosamente, los estudios de Paulsen y cols. (1981) y Anholm y cols. (1982) demostraron, respectivamente, un decremento en reposo o incremento durante la actividad en los valores de la velocidad de acortamiento.

1.2.1.2.2 Electrofisiológicas.

En el presente apartado se explicarán con detalle las principales modificaciones que el entrenamiento físico produce en las propiedades electrofisiológicas del miocardio.

Como es conocido, la práctica regular de ejercicio físico de resistencia produce cambios en una serie de parámetros electrofisiológicos, siendo especialmente significativos, por conocidos, los cambios sobre el automatismo y la conducción. Una característica clásicamente descrita del efecto del entrenamiento aeróbico sobre las adaptaciones cardiovasculares es la disminución de la frecuencia cardiaca en reposo y durante la realización de ejercicio de intensidad submáxima, en comparación con individuos sedentarios (Bonaduce y cols., 1998; Levy y cols., 1998; Wilmore y cols., 2001; Skinner y cols., 2003). Esta disminución de la frecuencia cardiaca,

bradicardia sinusal, es el “trastorno” del ritmo cardiaco más frecuente en el individuo entrenado (Boraita y cols., 1998). La mayoría de los autores piensan que es la modificación del equilibrio entre la acción del sistema nervioso simpático y del sistema nervioso parasimpático a favor de este último, la responsable de la citada disminución de la frecuencia cardiaca (de hecho, los efectos parasimpáticos ejercen el mismo efecto en lo que a la frecuencia cardiaca se refiere además de en otros parámetros). Estudios realizados por Sable y cols. (1982) evidenciaron el efecto del bloqueo β -adrenérgico en la modificación de varios parámetros cardiovasculares, entre ellos se encontraba la frecuencia cardiaca. Demostraron, mediante el bloqueo β -adrenérgico con propranolol, que la estimulación simpática es uno de los mecanismos fisiológicos más importantes a través de los cuales opera el entrenamiento físico con ejercicio dinámico. Otro estudio realizado por Shi y cols. (1995), investigaron el efecto de ambas divisiones del sistema nervioso autónomo, tanto el simpático como el parasimpático, concluyendo que la bradicardia presente en los individuos entrenados dependía exclusivamente de mecanismos nerviosos y, por tanto, no obtuvieron modificaciones de la frecuencia cardiaca intrínseca tras el bloqueo colinérgico y adrenérgico.

Por otro lado, nuestro grupo ya demostró en 2002 (Such y cols.) que en corazones aislados y perfundidos (y por tanto no sometidos a influencias nerviosas o humorales extrínsecas) procedentes de conejos sometidos a entrenamiento físico, presentaban una frecuencia cardiaca menor que corazones procedentes de conejos sedentarios. Este resultado se ha repetido en estudios similares (Such y cols, 2008; Zarzoso y cols., 2012).

En lo que respecta a la conducción, el entrenamiento no produce grandes cambios ni en la auricular ni en la ventricular, destacando los cambios

característicos que pueden observarse en la conducción auriculoventricular (AV). Estos cambios vienen definidos por la producción de bloqueos AV de primer grado e incluso de segundo grado tipo Wenckebach (Bjornstad y cols., 1993).

También ha sido demostrado por nuestro grupo en estudios ya citados (Such y cols., 2002 y 2008; Zarzoso y cols., 2012) un enlentecimiento de la conducción nodal en corazones aislados procedentes de conejos sometidos a entrenamiento físico.

En cuanto a la excitabilidad miocárdica, diferentes trabajos han estudiado el efecto del entrenamiento físico sobre determinados procesos electrofisiológicos relacionados con la refractariedad miocárdica. Un ejemplo de estos estudios es el de Brorson y cols. (1976), en el que investigaron los efectos del entrenamiento en humanos sobre el potencial de acción (PA) monofásico y la refractariedad auricular, observaron un aumento de la duración del potencial de acción y como consecuencia un incremento de la refractariedad en el grupo entrenado, atribuyéndolo a un aumento en la concentración intracelular de potasio.

Otros autores como Tibbits y cols. (1981), estudiando el efecto del entrenamiento sobre el acoplamiento excitación-contracción, encontraron también un aumento en la duración del potencial de acción en el grupo entrenado, que dichos autores atribuyeron a un aumento en la entrada de calcio. Del mismo modo, Gwathmey y cols. (1990) investigando en ratas el efecto combinado del entrenamiento y del envejecimiento sobre algunos parámetros fisiológicos, observaron un aumento en la duración del PA en el grupo entrenado, explicado con los mismos mecanismos.

Sin embargo, Hamra y McNeil (1997) estudiaron la posible alteración de la respuesta electrofisiológica celular en tejido subendocárdico aislado de perro ante agonistas adrenérgicos y colinérgicos por la realización de ejercicio físico crónico. Concluyeron, por los resultados obtenidos en el citado estudio, que el entrenamiento físico no influye sobre la respuesta negativa que el sistema colinérgico produce en propiedades exaltadas mediante estimulación adrenérgica.

En general no hay mucha información sobre el efecto del ejercicio físico crónico sobre la refractariedad intrínseca ventricular. En estudios ya citados como el de Such y cols. (2002) se evidenció, tras la aplicación de un protocolo de ejercicio físico de forma regular, que el periodo refractario funcional ventricular se incrementaba en los animales sometidos a dicho protocolo.

Estudios más recientes realizados por nuestro grupo de investigación, pero empleando un protocolo de entrenamiento de menor intensidad que el estudio citado en el párrafo anterior, han llegado a la misma conclusión, demostrando un aumento del periodo refractario efectivo y funcional (Such y cols., 2008; Zarzoso y cols., 2012) en los corazones procedentes de conejos entrenados.

Estos estudios en corazones aislados tienen una especial importancia como ya hemos comentado. Los hallazgos han sido evidenciados en corazones aislados, lo que demuestra que las modificaciones encontradas no son dependientes del sistema nervioso autónomo extrínseco o factores humorales.

Estudios que se realizaron en humanos para investigar las adaptaciones electrofisiológicas al ejercicio físico del nodo AV y del nodo sinusal, refirieron que atletas sometidos a bloqueo farmacológico del sistema nervioso autónomo, también presentaban un aumento de la refractariedad intrínseca en el sistema de conducción AV respecto a los sujetos control, también sometidos a bloqueo del sistema nervioso autónomo (Stein y cols., 2002).

Es importante también referirnos en este apartado a los cambios electrofisiológicos que se producen en situaciones donde existen anomalías miocárdicas. Nuestro grupo ha realizado estudios donde se describen los efectos del ejercicio físico en alguna de estas situaciones. Hemos investigado, como hemos citado, los efectos del ejercicio físico sobre varias propiedades electrofisiológicas, incluyendo parámetros concernientes al análisis de la fibrilación ventricular (FV) como la frecuencia dominante. Hemos podido observar una clara disminución de la frecuencia dominante media en corazones procedentes de conejos sometidos a entrenamiento. El citado decremento de la frecuencia dominante media se ha acompañado con el aumento de la refractariedad. Con los resultados obtenidos se concluyó que estas modificaciones electrofisiológicas podían proteger frente a la producción y perpetuación de arritmias reentrantes, sugiriendo la utilización del ejercicio físico aeróbico como tratamiento no-farmacológico frente a la muerte súbita, la cual es desencadenada por la entrada en fibrilación ventricular (Such y cols., 2008, Zarzoso, 2011).

La citada fibrilación ventricular, que es la arritmia motivo de nuestro estudio, y en la cual profundizaremos con posterioridad, es una arritmia denominada de reentrada en cuya aparición y perpetuación ejerce un papel

fundamental la heterogeneidad eléctrica miocárdica (para revisión ver cita de Jalife, 2000). Son ya clásicas las investigaciones de Han y Moe (1964), en las que se efectuaron una serie de experimentos para comprobar los efectos de varios agentes farmacológicos sobre el período refractario del músculo ventricular, estableciendo la importancia de la heterogeneidad en el período refractario para la inducción de FV. Ya previamente, Moe y Abildskov (1959) demostraron que la fibrilación auricular (FA) podía persistir con una serie de características (p.ej.: autosostenida e independiente de su agente productor), pero únicamente si existía una “inhomogeneidad” en la repolarización. Sabemos que el miocardio es un sincitio funcional, pero no es absolutamente homogéneo desde el punto de vista electrofisiológico. Existe falta de continuidad y falta de homogeneidad en el mismo, tanto a nivel estructural, como desde el punto de vista de las propiedades eléctricas de la membrana, lo que se agrava ostensiblemente en situaciones patológicas, como es el caso de la isquemia. Este incremento de heterogeneidad es responsable de la aparición de bloqueos en la conducción, dispersión espacial de la repolarización, etc. (Kléber y Rudy, 2004), lo que a su vez facilita la aparición del fenómeno de reentrada y las arritmias ligadas al mismo. El papel de la heterogeneidad en la aparición de fenómenos ligados a la FV ha sido relatado por Kléber y Rudy (2004) en una revisión al respecto, una de cuyas conclusiones es que “la interacción entre la cabeza de un frente de onda y la cola del frente de onda precedente es un determinante importante del período de rotación de un PA reentrante, de la estabilidad de la reentrada y de la onda de excitación espiral”. En principio, la inestabilidad de los rotores puede resultar únicamente como una consecuencia de esta interacción, en un medio completamente homogéneo y eléctricamente continuo. Sin embargo, la heterogeneidad, que es inherente al tejido cardiaco

(expresión y función de los canales iónicos, conexiones intercelulares, estructura tisular) se acentúa durante la remodelación del tejido enfermo y esto es determinante para las ondas de reentrada y sus propiedades dinámicas, con importantes consecuencias para las arritmias cardíacas.

Otro parámetro a valorar en una FV, es la complejidad del proceso de activación miocárdica. Esta propiedad se encuentra condicionada por los parámetros citados anteriormente, tanto por la refractariedad como por la heterogeneidad, y consecuentemente puede modificarse por el ejercicio físico, al igual que los otros parámetros como hemos visto anteriormente (Chorro y cols. 2000).

Hay poca bibliografía al respecto, es por ello que nos hemos de referir a un estudio realizado por Díaz en 2012, en el que se pudo comprobar que el ejercicio físico crónico sí que producía modificaciones en la complejidad del proceso de activación durante la FV en un modelo de corazón aislado de conejo. En este estudio concluyeron que el entrenamiento físico regular produce una disminución de la complejidad del trazado fibrilatorio. Interpretando la citada disminución como un efecto beneficioso que indica la posibilidad de incrementar la estabilidad eléctrica del miocardio ventricular a través de la realización de ejercicio físico crónico.

1.2.2 Sistema nervioso autónomo (SNA).

1.2.2.1 Generalidades.

El sistema nervioso puede ser dividido en sistema nervioso central, compuesto a su vez por el encéfalo y la médula espinal, protegidos por huesos y por el líquido cefalorraquídeo y en sistema nervioso periférico, constituido por axones neuronales que conectan el sistema nervioso central con las demás partes del cuerpo. El sistema nervioso periférico podemos dividirlo en dos partes a su vez, los aferentes que son vías sensoriales de información al sistema nervioso central y los eferentes. Estos últimos son axones motores que inervan finalmente bien a las células musculares esqueléticas (sistema motor somático, es decir motoneuronas alfa) o bien a los efectores autonómicos (músculo liso, cardíaco y glándulas). A pesar de que la actividad de los eferentes autonómicos no está controlada por la voluntad y muchos de sus efectos pasan inadvertidos a la conciencia del individuo, puede decirse que su acción es fundamental para la vida, ya que controlan procesos vitales con la presión arterial o actividad cardíaca entre otras muchas funciones corporales.

El sistema nervioso autónomo se activa principalmente a partir de centros situados en la médula espinal y el tronco del encéfalo y están jerarquizados por el hipotálamo, sistema límbico e incluso por la corteza cerebral que también puede transmitir señales hacia centros inferiores e influir sobre el control autónomo. Los eferentes autonómicos son activados en general por reflejos viscerales.

Las señales autónomas eferentes se transmiten hacia diversos efectores del cuerpo a través de sus dos vertientes, el sistema nervioso simpático y el sistema nervioso parasimpático.

Estas vías se estructuran básicamente en dos neuronas. La primera tiene su origen en los centros vegetativos bulbares o medulares y hacen sinápsis con una segunda neurona que terminará en los diferentes órganos. Allí realizará la transmisión del impulso nervioso con las células efectoras.

Ambas divisiones autonómicas se diferencian morfológicamente. La primera neurona de los eferentes simpáticos se origina en los centros medulares situados entre el primer segmento torácico y el segundo lumbar, es relativamente corta; no llega en general (exceptuando los que se dirigen a la médula suprarrenal) al órgano efector, con lo que la etapa sináptica con la segunda neurona la establecen en una estructura localizada en diferentes partes del organismo. Son los denominados ganglios. Estas estructuras y la sinápsis que en ellas se realiza da lugar a la nominación de las neuronas que forman las vías eferentes autonómicas como pre y postganglionar (figura 1.1).

La transmisión sináptica ganglionar simpática es química y mediada por acetilcolina que se une a receptores nicotínicos de la neurona postsináptica. Esta neurona a su vez transmite el impulso a las células efectoras gracias a la liberación de adrenalina y noradrenalina en mayor cantidad que se fijarán a diferentes tipos de receptores α o β . También, aunque en menos número, hay liberación de acetilcolina por determinadas neuronas simpáticas postganglionares.

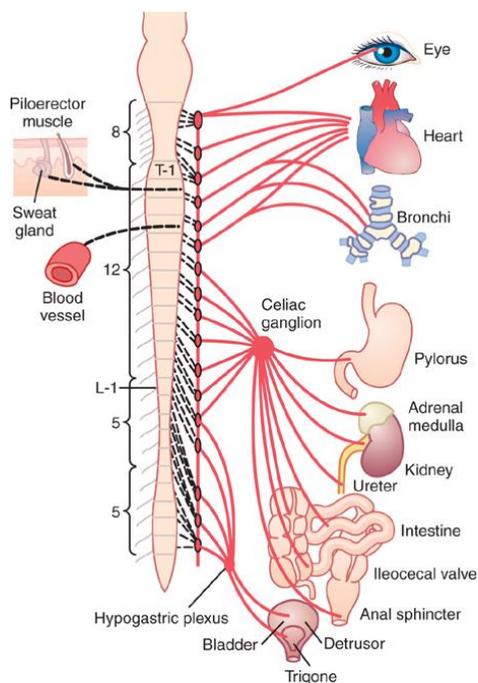


Figura 1.1 Representación de los centros medulares donde se origina la primera neurona de los eferentes simpáticos. Tomado de Guyton y Hall (2006).

La división parasimpática es básicamente diferente. Los centros de los cuales parten las neuronas preganglionares están ubicados en bulbo raquídeo y en la médula sacra (figura 1.2). Exceptuando determinados eferentes parasimpáticos craneales, las sinapsis entre neuronas preganglionares y postganglionares parasimpáticas se llevan a cabo en la misma víscera.

La transmisión sináptica entre las neuronas pre y postganglionares se produce de igual forma que en el sistema simpático, es decir, liberación de acetilcolina por la neurona preganglionar y unión del neurotransmisor a receptores nicotínicos postsinápticos. La neurona postganglionar parasimpática, libera también acetilcolina que para la transmisión del

impulso a las células efectoras, se ha de fijar a receptores muscarínicos, que pueden ser de varios tipos en función de la localización de las células efectoras.

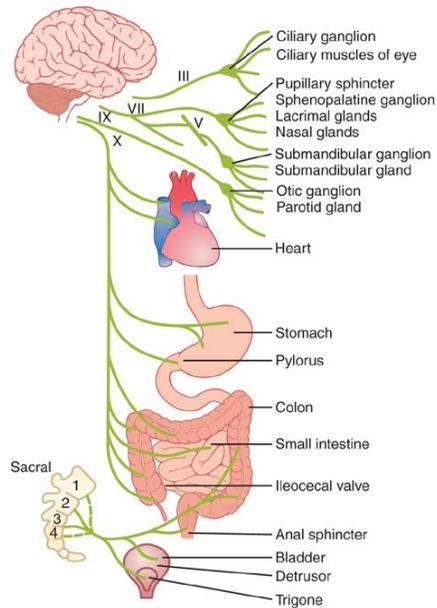


Figura 1.2 Representación del bulbo raquídeo y médula sacra donde se originan las neuronas preganglionares parasimpáticas. Tomado de Guyton y Hall (2006).

1.2.2.2 El SNA en el corazón.

Como acabamos de comentar en el apartado anterior el SNA consta de dos vertientes de inervación la autónoma: la simpática y la parasimpática. Como norma general se comportan de forma opuesta, en cuanto a sus efectos sobre el corazón se refiere y siempre de una manera muy finamente ajustada.

Cuando se estimula el sistema nervioso simpático se aprecian unos efectos determinados sobre la función cardíaca, concretamente electrofisiológicos y mecánicos. Efectivamente y como es ampliamente conocido, la estimulación simpática aumenta la frecuencia y la fuerza de contracción del corazón. Sin embargo, el efecto que el sistema nervioso parasimpático produce sobre estas dos variables cardíacas es totalmente opuesto al anterior. El efecto que produce es inhibitorio y disminuirá tanto la frecuencia cardíaca como la fuerza de contracción en la medida que corresponda. La interacción entre los efectos reguladores de estas dos vertientes que componen el sistema nervioso autónomo es compleja y susceptible de modulación a diferentes niveles, ya sea los mecanismos de barrorrecepción o quimiorrecepción sometidos a control central hasta las interacciones interneuronales locales (Levy y cols., 2006). Los efectos electrofisiológicos del SNA sobre el corazón serán abordados con mayor profundidad en el apartado siguiente.

La estructura de las dos ramas del SNA está compuesta por neuronas aferentes, eferentes y neuronas de circuito local.

1.2.2.2.1 El sistema nervioso extrínseco.

Los cuerpos de las neuronas aferentes cardíacas están localizados principalmente en el lado izquierdo de los ganglios de la raíz dorsal craneal torácica (Armour, 2004). En lo que se refiere a las neuronas aferentes cardíacas se localizan anatómicamente de manera bastante uniforme a lo largo del ganglio nodoso (Hopkins y Armour, 1989) y los ganglios de la raíz dorsal (Brown, 1967), desde la raíz cervical 7 hasta la raíz torácica 4 del nivel de la médula espinal, de forma bilateral (Vance y Bowker, 1983). También han sido identificados en los ganglios intratorácicos, y por tanto

extracardiacos (Armour, 1986, Horackova y cols., 1996), pero también en los ganglios intrínsecos propios del corazón (Armour y Hopkins, 1990a; 1990b). Sus terminaciones nerviosas están localizadas en el origen de las venas cavas superior e inferior, en el nodo sinusal, la zona dorsal de la aurícula, los tractos de salida de ambos ventrículos y el arco interior de la aorta (Armour, 1973). Estas neuronas aferentes transducen señales de tipo mecánico, señales de tipo químico o ambas, ya que la mayoría de las neuronas aferentes transducen estímulos de diferente naturaleza, pudiendo detectar alteraciones tanto mecánicas como químicas (Huang y cols., 1996).

En cuanto a los eferentes cardiacos, se sabe que las neuronas preganglionares se encuentran localizadas en el tronco del encéfalo en el caso del parasimpático y la médula espinal en el caso del simpático. Las neuronas simpáticas postganglionares se encuentran situadas principalmente en los troncos simpáticos extrínsecos (Pauza y cols., 2002a), recibiendo la información sináptica directa de las neuronas preganglionares simpáticas localizadas en la médula espinal, desde las raíces dorsales T1 a la T5 (Norris y cols., 1977). Los cuerpos celulares de las neuronas postganglionares se localizan en los polos craneales del ganglio estrellado, a lo largo de los ganglios cervicales medio y superior (derecho e izquierdo) del mediastino y en los ganglios adyacentes al corazón (Hopkins y Armour, 1984, Horackova y cols., 1999) (figura 1.3).

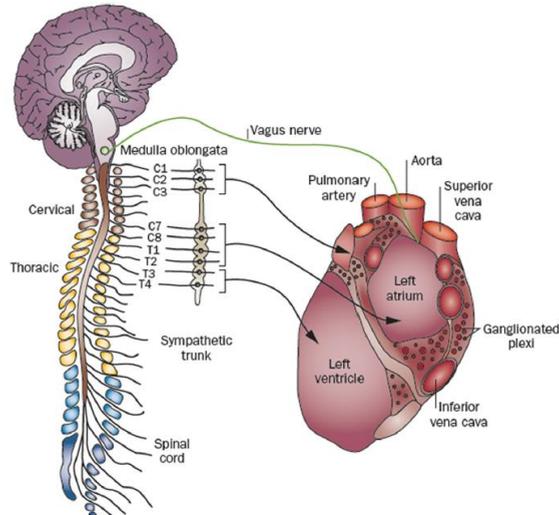


Figura 1.3 Representación esquemática de la inervación autónoma del corazón. Tomado de Shen y Zipes (2014).

Los cuerpos de las neuronas preganglionares eferentes parasimpáticas hacen sinapsis con neuronas eferentes postganglionares, que se encuentran localizadas a diferencia del sistema simpático, intrínsecamente. Las neuronas preganglionares parasimpáticas están situadas principalmente en la región ventral lateral del núcleo ambiguo del bulbo raquídeo (Mc Allen y Spyer, 1976). Un menor número de población de neuronas se encuentran también en la zona intermedia entre estos dos núcleos medulares (Hopkins y Armour, 1984). Las neuronas preganglionares proyectan sus axones, desde estas zonas, hacia las neuronas postganglionares distribuidas a través de los principales plexos ganglionares auriculares y ventriculares (Gray y cols., 2004). En la figura 1.4 se puede observar una representación más detallada sobre el origen de la inervación parasimpática y las vías nerviosas que confluyen en el corazón.

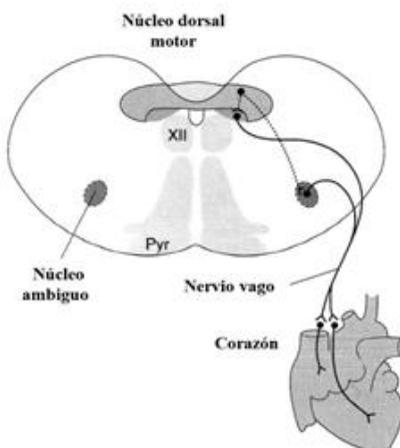


Figura 1.4 Inervación parasimpática del corazón. Modificado de Ganong (2004).

En resumen, haces de neuronas simpáticas y parasimpáticas proyectan sus axones hacia varias regiones del corazón, incluyendo el nodo sinusal, el nodo AV, aurículas y ventrículos. En la siguiente tabla puede verse una breve comparación de las características de las neuronas parasimpáticas y simpáticas cardíacas:

	N. simpáticas	N. parsimpáticas
Neurotransmisor (postganglionar)	<i>Noradrenalina</i>	<i>Acetilcolina</i>
Patrón de distribución nerviosa	<i>Difuso</i>	<i>Local</i>
Densidad en aurícula	<i>Alta</i>	<i>Moderada</i>
Densidad en nodos	<i>Alta</i>	<i>Alta</i>
Densidad en ventrículo izquierdo	<i>Alta</i>	<i>Baja</i>
Receptores postsinápticos	<i>beta-adrenérgicos</i>	<i>Muscarínicos</i>
Comportamiento en el corazón	<i>Facilitador</i>	<i>Inhibidor</i>

Tabla 1.1 Características de las neuronas autónomas cardíacas. Modificado de Raffel y Wieland (2001).

Consideramos importante incidir acerca de los denominados circuitos locales neuronales que afectan a la función cardíaca dentro de este apartado de inervación extrínseca, aunque también retomaremos el tema dentro de la inervación intrínseca.

Las neuronas de circuito local se localizan entre las neuronas aferentes y eferentes. Estas neuronas pueden proyectar sus axones a otras neuronas dentro del mismo ganglio, incluyendo las que se encuentran en el corazón (Armour, 1991), o a otros ganglios diferentes, pero siempre a nivel intratorácico. Estas disposiciones anatómicas implican unas interacciones múltiples entre las neuronas intratorácicas involucradas en coordinar la respuesta cardíaca local (Armour, 2004). Estas conexiones permiten un intercambio de información no solamente entre las neuronas localizadas en un mismo ganglio intratorácico sino también en las localizadas en diferentes ganglios también intratorácicos. Las neuronas presentes en el corazón son las últimas responsables de la coordinación de la información de forma centrífuga y centrípeta influyendo tanto en los índices cardíacos eléctricos como mecánicos. Las neuronas del sistema nervioso intrínseco del corazón están constantemente interactuando con aquellas neuronas situadas en los ganglios intratorácicos extracardiacos, así como con neuronas del sistema nervioso central para regular la respuesta motora del corazón. Algunas neuronas de los circuitos locales intrínsecos incluso reciben inputs procedentes de las neuronas eferentes simpáticas y parasimpáticas, indicando que algunas neuronas procesan inputs de ambas ramas del sistema nervioso autónomo, y no necesariamente de manera recíproca. Por lo tanto, las alteraciones del medio extracardíaco pueden también influir el sistema nervioso intrínseco de manera indirecta (Armour, 2004).

En cuanto al funcionamiento del complejo entramado nervioso, existen distintos planteamientos propuestos por diferentes autores, entre ellos se encuentran los que apoyan la teoría del control regional, en donde las neuronas de un plexo ganglionar cardíaco ejercen control únicamente sobre las regiones adyacentes (Gatti y cols., 1995). Sin embargo, las neuronas pertenecientes a cada uno de los grandes plexos cardíacos pueden ejercer control sobre modificaciones de tipo mecánico o eléctrico en todas las cavidades cardíacas (Yuan y cols., 1993). Este hecho va en la línea de la idea de que las neuronas de cada plexo intracardiaco están en constante comunicación entre sí (Randall y cols., 2003).

Armour (2004) propuso un modelo hipotético de la jerarquía nerviosa cardíaca en el que se intenta explicar el funcionamiento de este complejo entramado nervioso (figura 1.5). La información que es conducida por vía aferente, procedente del corazón y de los grandes vasos, inicia una serie de respuestas reflejas centrales y periféricas que controlan las neuronas motoras cardíacas (vía eferente). Dicho control puede resolverse en dos cuestiones básicas: 1) cómo las neuronas aferentes transducen la información sobre su entorno directa o indirectamente a las neuronas motoras cardíacas y 2) el tipo y escala temporal (latencia de los reflejos) de la información que es enviada a las neuronas motoras. Las propiedades de corto alcance de las neuronas mecanosensitivas cardíacas de respuesta rápida generan reflejos de corta latencia que ejercen influencia rápidamente sobre poblaciones seleccionadas de neuronas motoras. Su relativamente corta distancia a la primera sinapsis permite una activación diferencial de las neuronas cardíacas motoras durante fases específicas del ciclo cardíaco (Armour, 1976) para ejercer una coordinación de la frecuencia cardíaca y la contractilidad

regional latido a latido (Armour y cols., 1970). Estos reflejos mecanosensitivos de ciclo corto están sometidos a control nervioso central (Armour, 1991). Por otro lado, existen poblaciones de neuronas aferentes que transducen el entorno químico cardíaco hacia neuronas intratorácicas y de centros superiores de integración, llevando a cabo esta tarea a través de respuestas más lentas, que son reflejo de un entorno químico que cambia normalmente de forma más lenta (Kember y cols., 2001).

El control autónómico del corazón se logra a través de coordinar las salidas de los sistemas eferentes parasimpáticos y simpáticos por medio de múltiples ciclos de retroalimentación del sistema nervioso cardíaco, formando todas las neuronas un neuro-eje cardíaco (Armour, 2008).

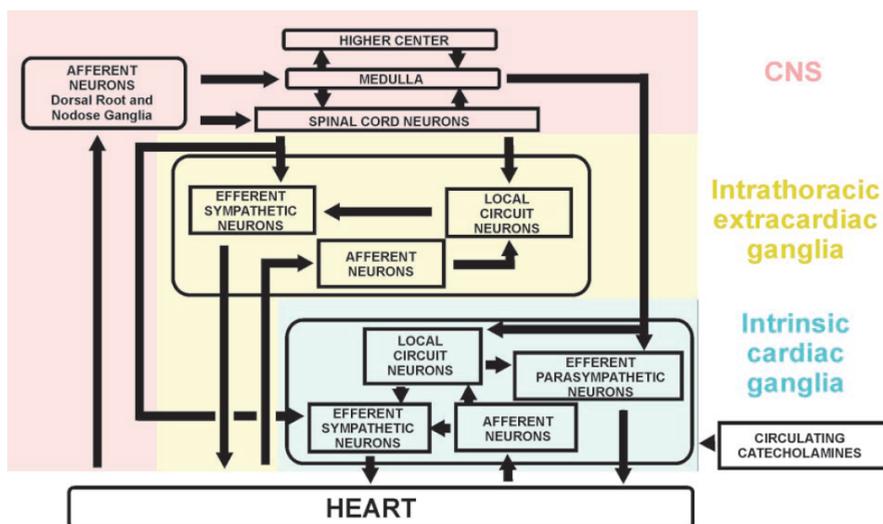


Figura 1.5 Modelo hipotético de la jerarquía nerviosa cardíaca. La información sensorial es transducida por las neuronas aferentes, situadas en los ganglios intratorácicos intrínsecos y extrínsecos, a través de neuronas de circuito local hasta las neuronas eferentes. La información sensorial cardíaca es también llevada a los centros nerviosos superiores para producir respuestas de bucle largo. Las catecolaminas circulantes ejercen efectos directos sobre el sistema nervioso intrínseco cardíaco. Tomado de Armour (2004).

1.2.2.2.2 Sistema nervioso intrínseco

Como ya hemos hecho alusión en el apartado anterior, además del SNA extrínseco cardiaco, el corazón también está innervado por un complejo SNA intrínseco cardiaco. Que podríamos definir como aquél que permanece en el corazón después de una denervación extrínseca total (Napolitano y cols., 1965). También lo podríamos denominar como el último integrador común del control cardiaco regional (Cardinal y cols., 2009). El corazón posee un plexo cardiaco nervioso que le proporciona una innervación básica propia, formado por los elementos neuronales que sobreviven a la denervación quirúrgica del corazón. Este plexo cardiaco está constituido por células nerviosas autónomas sensitivas, eferentes e interneuronas. A lo largo del corazón existen numerosos ganglios cardiacos, cada uno de los cuales contiene entre 200 a 1000 neuronas (Pauza y cols., 2000), estando todos los cuerpos celulares del complejo SNA intrínseco localizados en los ganglios intramurales, estos ganglios hacen sinapsis con las fibras simpáticas y parasimpáticas que entran en el espacio pericárdico. La gran mayoría de estos ganglios están organizados en los plexos ganglionares que se encuentran ubicados en la superficie, concretamente en la grasa epicárdica, tanto en la base de las aurículas, en el septo interauricular y en las zonas craneales de los ventrículos, como en la zona intramural del corazón (Armour y cols., 1997; Pauza y cols., 2000). El número de ganglios que han sido caracterizados en el corazón varía en función de la especie analizada, pudiendo encontrarse desde 4 plexos ganglionares en la rata (Pardini y cols., 1987) hasta 10 en el corazón humano (Armour y cols., 1997).

La innervación intrínseca del corazón ha sido tema de estudio desde los años 70, y es por ello que ha ido evolucionando a lo largo de estos años;

cuando se inició el estudio se pensaba que el sistema nervioso intrínseco cardiaco estaba formado únicamente por neuronas parasimpáticas postganglionares y sus axones, además de células cromafines intramiocárdicas. Investigaciones posteriores han demostrado la existencia de un complejo sistema nervioso intracardiaco en el corazón de diversas especies de mamíferos como el conejo (Papka, 1976; Saburkina y cols., 2014), la rata (Pardini y cols., 1987), la cobaya (Hassal y Burnstock, 1986), el perro (Yuan y cols., 1994), el ser humano (Armour y cols., 1997). Es por ello que podemos decir que el SNA intrínseco cardiaco forma una red compleja compuesta de plexos ganglionares, concentrados dentro de grasa epicárdica, y los ganglios de interconexión y axones (Yuan y cols., 1994; Armour y cols., 1997; Pauza y cols., 2002b).

Así pues, podemos decir que los plexos ganglionares pueden funcionar como centro de integración modulando las interacciones autonómicas complejas entre el SNA extrínseco cardiaco y el SNA intrínseco cardiaco (Hou y cols., 2007).

Como ya hemos estado comentando, se han identificado grupos de plexos ganglionares tanto en las aurículas como en los ventrículos. En el caso de las aurículas los podemos encontrar en distintos lugares de las paredes de la cámara (Armour y cols., 1997), más concretamente, podemos decir que el nodo sinusal se encuentra principalmente inervado por los plexos ganglionares de la aurícula derecha, mientras que el nodo AV está inervado por plexos ganglionares ubicados en la unión entre la vena cava inferior y la aurícula izquierda (Armour, 2010; Pauza y cols., 2000; Hou y cols., 2007). Otra región que está altamente inervada por el SNA y que posee una alta densidad de plexos ganglionares es la zona en donde se unen las venas

pulmonares con la aurícula izquierda. En esta unión se encuentran muy cerca ubicados los nervios adrenérgicos y colinérgicos (Tan y cols., 2006). Aunque en el caso de los plexos ganglionares auriculares parecen estar ubicados en muchos sitios de las paredes de la cámara auricular, no ocurre lo mismo en el caso de los plexos ganglionares ventriculares ya que se encuentran más localizados, principalmente en el origen de varios vasos principales cardiacos: los vasos que rodean la raíz aórtica, del principio de las arterias coronarias derecha e izquierda, el origen de la arteria descendente posterior, el inicio de la arteria coronaria marginal izquierda y el origen de la arteria coronaria marginal derecha (Armour y cols., 1997; Armour, 2010).

En la figura 1.6 podemos ver punteado en rojo una representación esquematizada de la distribución de las neuronas cardiacas intrínsecas en un corazón de conejo (Saburkina y cols., 2014).

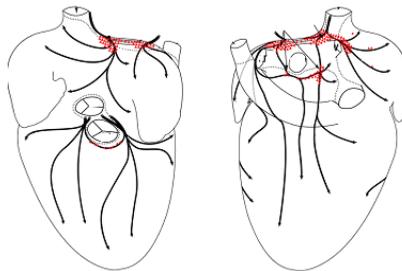


Figura 1.6 Representación de las neuronas cardiacas intrínsecas.

Junto a la complejidad anatómica que presenta el sistema existe una diversidad funcional de las neuronas que lo componen. En este sentido existe diversidad en cuanto a los tipos de neuronas intracardiacas como las postganglionares simpáticas y parasimpáticas, neuronas sensoriales e

interneuronas (figura 1.7). Estas neuronas sintetizan diferentes neurotransmisores: además de acetilcolina, algunas neuronas poseen enzimas para la biosíntesis de monoaminas, también se han encontrado poblaciones de células que sintetizan dopamina, serotonina, adrenalina y noradrenalina (Slavikova y cols., 2003), enzimas para la síntesis de histamina (Singh y cols., 1999), además de varios neuropéptidos como el neuropéptido Y o el péptido intestinal vasoactivo (Steele y cols., 1994; Slavikova, 1997). También se han identificado neuronas inmunorreactivas a la óxido nítrico sintasa (Tanaka y cols., 2001). Como puede observarse, esta diversidad química en las neuronas intracardíacas podría reflejar una especialización funcional de las mismas (Richardson y cols., 2003).

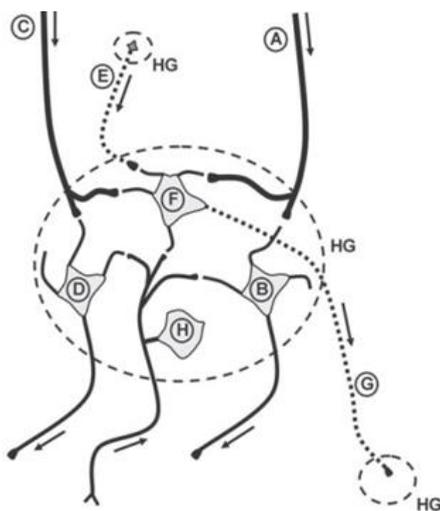


Figura 1.7 Esquema simplificado de las neuronas en los ganglios cardíacos y sus proyecciones. Las flechas indican la dirección de la transmisión de la señal. A-B neuronas parasimpáticas preganglionares y postganglionares; C-D neuronas simpáticas preganglionares y postganglionares; E axón de neurona localizada en otro ganglio cardíaco; F circuitos locales; G axón inervando otro ganglio cardíaco; neurona sensorial intracardíaca; HG ganglio cardíaco (Kukanova y Mravec, 2006).

Las neuronas intracardíacas pueden mostrar una actividad espontánea que es modulada por las neuronas extracardíacas y que también está influida por el entorno local cardiovascular gracias a la información proporcionada por una serie de mecanorreceptores y quimiorreceptores de las propias neuronas intracardíacas (Arora y cols., 2001). Los circuitos del sistema nervioso intracardíaco permiten modular la actividad del corazón también en condiciones en las que la influencia del control nervioso extracardíaco se suprime, como en el caso del corazón transplantado (Armour, 1999).

El sistema nervioso cardíaco intrínseco es un lugar de integración primaria para la actividad eferente simpática y parasimpática, respondiendo a las entradas descendentes centrales, a las aferentes sensoriales, y a las entradas neuronales del circuito local. En este sistema se representa la vía final común para el sistema nervioso cardíaco, y tiene el papel primario de coordinar latido a latido la función cardíaca regional (Armour, 2008).

1.2.2.3 Neurotransmisión colinérgica. Bloqueo de la misma.

Centrándonos en las neuronas parasimpáticas, como ya hemos comentado la acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor parasimpático y generalmente media el efecto cronotrópico e inotrópico negativo a través de su acción en los receptores muscarínicos (Nouchi y cols., 2007).

La familia de los receptores muscarínicos se compone de 5 subtipos molecularmente distintos. Esta clasificación está fundamentada en sus propiedades de unión a la proteína G, los cinco receptores pueden ser subdivididos en clases funcionales principales. Los receptores M₁, M₃ and M₅ suelen unirse a la proteína G_{q/11} que activa la fosfolipasa C, mientras que los

subtipos M_2 y M_4 están principalmente acoplados a la proteína $G_{i/o}$ que inhibe la actividad de la adenilato ciclasa (Caulfield, 1993). Los receptores muscarínicos están distribuidos a lo largo de los tejidos periféricos.

En un estudio realizado por Ito y cols. (2009), demostraron la alta presencia de los receptores M_2 en corazones de ratón, tanto a nivel auricular como ventricular, en la misma línea que otros autores que realizaron estudios similares (Peralta y cols., 1987; Maeda y cols., 1988; Levey, 1993). Siendo, por tanto, el receptor M_2 muscarínico el más abundante en el caso del tejido cardíaco. Aunque existen estudios en donde muestran la presencia de otros receptores muscarínicos como los tipo M_3 en corazones humanos y de otras especies de mamíferos (Liu y cols., 2013; Osadchii, 2008) y de otros tipos como el M_1 (Osadchii, 2008) involucrados en la respuesta vagal inducida.

Dado que el receptor M_2 es el más abundante en el miocardio, vamos a centrarnos en su descripción con mayor profundidad. La ocupación del receptor M_2 por la ACh, activa la proteína G-inhibidora, formada por las subunidades α - β - γ , lo que resulta en (figura 1.8):

- La activación de canales de potasio dependientes de ACh ($I_{K_{ACh}}$). La activación de estos canales provoca una hiperpolarización del potencial de reposo, lo que ralentiza la frecuencia cardíaca y la conducción en el nodo AV.
- Una inhibición de la adenilato ciclasa por acción de la GTP-asa, lo que provoca una menor disponibilidad de AMPc, disminuyendo la frecuencia cardíaca y la contractilidad.

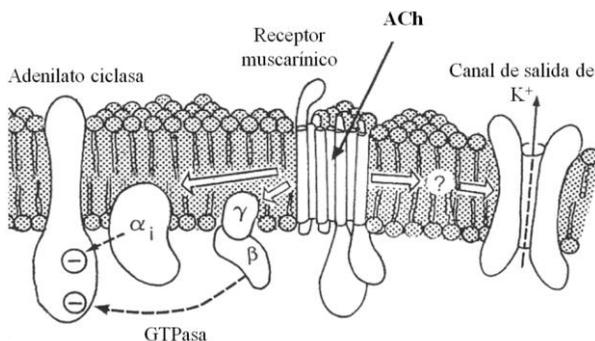


Figura 1.8 Mecanismos de la estimulación parasimpática. Modificado de Opie (2004).

Para poder estudiar la participación de estos receptores muscarínicos en las modificaciones que se observan en el miocardio empleamos un antagonista de estos receptores, en este caso empleamos la atropina, para abolir la acción muscarínica y así poder distinguir sus posibles acciones miocárdicas.

Los antagonistas de los receptores muscarínicos, es decir los fármacos parasimpaticolíticos, son antagonistas competitivos y suelen contener en su estructura química grupos estéricos y básicos en la misma proporción que la ACh, pero se diferencian en que poseen un grupo aromático voluminoso en lugar del grupo de acetilo. La atropina, es un alcaloide procedente de plantas solanáceas, concretamente de la belladona, es un compuesto de amonio terciario bastante liposoluble y carece de selectividad frente a los cinco subtipos de receptores muscarínicos (Rang y cols., 2008). La molécula de atropina es un éster del hidroxitropano con el ácido trópico (α -hidroximetilfenilacético), concretamente es una endo- α -(hidroximetil) bencenoacetato ácido 8-metil-8-azabicyclo [3.2.1]oct-3-ilo ester, con fórmula

empírica $C_{17}H_{23}NO_3$ (figura 1.9) (Fuente: BotPlusWeb del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos).

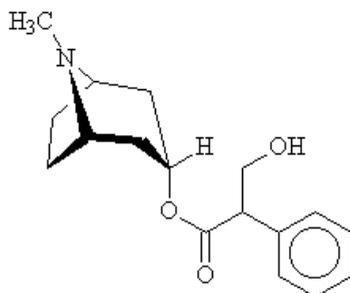


Figura 1.9 Estructura molecular de la atropina. (Fuente: BotPlusWeb del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.).

1.2.2.4 Efectos del SNA sobre la electrofisiología cardiaca.

En primer lugar hablaremos de la interacción existente entre el sistema nervioso simpático y parasimpático. El fundamento, aunque simple, que caracteriza las influencias autonómicas en el corazón es su naturaleza ying-yang. La interacción en la función cardiaca entre los dos brazos del SNA es compleja, es por ello que a lo largo de los tiempos se han ido haciendo muchos estudios experimentales para conocer su funcionamiento. Unas investigaciones realizadas por Rosenblueth y Simeone, sobre los años 30, observaron, por primera vez, que en gatos anestesiados la reducción absoluta de la frecuencia cardiaca producida por un estímulo vagal dado, fue considerablemente mayor cuando se realizaba durante una estimulación simpática tónica (Rosenblueth y Simeone, 1934). Un año después del descubrimiento realizado por Rosenblueth y Simeone se obtuvieron hallazgos similares pero esta vez en perros (Samaan, 1935). Unos años más

tarde Levy (1971) acuñó el término de antagonismo acentuado para describir el mayor efecto cronotrópico negativo de la estimulación vagal en presencia de estimulación simpática de fondo. La acción antagónica vagal, por acciones opuestas simpáticas a ambos niveles, pre y postganglionares, existe, no solamente sobre el efecto cronotrópico sino también en el control de la función ventricular, en el control del calcio intracelular, y en la electrofisiología cardiaca (Martins y cols., 1980; Levy y cols., 1969; Brack y cols., 2004). Muy recientemente también se ha comprobado usando un dispositivo implantado para registrar de forma continua la actividad autónoma nerviosa en perros de manera ambulatoria, que la estimulación crónica del vago izquierdo produce una disminución significativa de la actividad de los eferentes simpáticos originados en el ganglio estrellado izquierdo (Shen y cols., 2011).

Es evidente, como expone esta pequeña introducción a este punto, y como es ampliamente conocido, la participación del sistema nervioso autónomo sobre el control de la electrofisiología cardiaca. Vamos a abordar a continuación y en mayor profundidad, los efectos de la actividad autónoma sobre las propiedades eléctricas miocárdicas.

1.2.2.4.1 Automatismo sinusal.

El automatismo miocárdico se inicia gracias a la descarga espontánea y periódica de impulsos eléctricos que tiene lugar en el nodo sinoauricular (SA) y conlleva, en situación fisiológica, a la contracción rítmica del corazón. Esta característica también es compartida por determinadas células del nodo AV y del sistema especializado de conducción ventricular.

La mayoría de las células que se encuentran en la región del nodo SA presentan el característico potencial transmembrana oscilante asociado con la actividad marcapasos, incluyendo un potencial diastólico inestable y una despolarización gradual que se va acercando poco a poco al umbral de apertura de determinados canales iónicos voltaje dependientes y con ello a la génesis de un PA (Jalife y cols., 2009). De este modo, podemos decir que el automatismo sinusal se debe a la despolarización paulatina aunque lenta, de la membrana de las células marcapasos durante la fase 4 de su PA.

En cuanto a las bases iónicas del automatismo sinusal, comentaremos a continuación brevemente los movimientos iónicos que acontecen durante las diferentes fases del PA.

En primer lugar, la despolarización progresiva que se produce durante la fase 4 del PA y que caracteriza a las células nodales, resulta (al menos en parte), de la activación de la corriente I_f (esta corriente se genera al abrirse los canales de Na^+). Esta corriente se activa con la hiperpolarización del potencial de membrana y permite la entrada de cargas positivas en la célula de forma gradual y, con ello, la despolarización progresiva y continua hasta que la membrana alcanza el umbral para la apertura de canales voltaje dependiente como ya hemos reflejado. También participa en esta fase la corriente transitoria de Ca^{2+} como podemos ver en la figura 1.10. Al alcanzarse aproximadamente los -40 mV de diferencia de potencial transmembrana, se produce el PA, caracterizado por una rápida despolarización en la que la diferencia de potencial de membrana alcanza valores positivos. Ello es producido por la entrada de iones Ca^{2+} y Na^+ . Es entonces cuando comienza la repolarización de las células, provocada por la apertura de diferentes tipos de canales de potasio (K^+), lo que conlleva a

diversas corrientes de salida del citado ion y con ello la salida de cargas positivas de la célula (figura 1.10).



Figura 1.10 Las corrientes marcapasos en el nodo SA. Modificado de Opie, (2004).

Los efectos del sistema nervioso autónomo en el control sobre el nodo SA son fundamentales para la regulación de la actividad cardiaca.

Cuando nos referimos al efecto del sistema nervioso parasimpático, es la ACh y su efecto sobre los receptores M_2 , la responsable de la reducción de la amplitud, de la tasa de incremento y la duración del PA en el nodo SA (figura 1.11). Durante la estimulación vagal fisiológica, la actividad marcapasos del nodo SA no se detiene sino que cambia hacia aquellas células que tienen una frecuencia de descarga menor. También debemos añadir, el efecto de la ACh sobre los canales de salida de K^+ , pudiendo provocar la apertura de dichos canales de manera que fluye la corriente de salida de K^+ dependiente de ACh ($I_{K_{ACh}}$). El canal que está implicado en el citado fenómeno es el denominado canal muscarínico de K^+ y es activado por el efecto de la ACh como ya hemos comentado. Cuando este canal se

abre, el potencial de membrana del nodo SA alcanza valores más negativos (se hiperpolariza) en respuesta a la salida de los iones de potasio con carga positiva. Asimismo, dicha hiperpolarización hace que aumente el tiempo que tarda en alcanzarse el umbral de activación (-40 mV) a causa del voltaje inicial, que parte de un valor más negativo, disminuyendo de este modo la frecuencia de disparo del nodo SA. Además, la ACh inhibe la corriente de calcio tipo L, denominada I_{Ca-L} lo que retrasa la fase 0 del potencial de acción (despolarización). Este efecto bradicardizante producido por el aumento del tono vagal es coincidente con los efectos del ejercicio físico prolongado.

Sin embargo, el bloqueo con atropina en corazones aislados de conejo, no produce ningún efecto sobre el automatismo sinusal intrínseco (Zarzoso, 2011).

En lo que respecta a los efectos de la estimulación simpática β -adrenérgica presenta una mayor complejidad que los efectos que produce la estimulación parasimpática. La estimulación adrenérgica puede causar un cambio en el marcapasos desde el foco dominante normal de las células marcapasos, con su PA característico, a un patrón más parecido al del territorio auricular y por tanto más polarizado durante la diástole (figura 1.11). Los mecanismos que llevan a esta hiperpolarización con la estimulación β -adrenérgica son controvertidos, pero diferentes de la hiperpolarización causada por la ACh, probablemente provocados por un incremento en la actividad de la bomba sodio-potasio. Esta hiperpolarización provoca una activación temprana de I_f e I_{Ca-L} produciendo un aumento en la velocidad de despolarización y también en la frecuencia de disparo del nodo SA.

Estos mecanismos explican cómo, por ejemplo, la estimulación adrenérgica que se produce durante el ejercicio provoca la taquicardia necesaria para incrementar el trabajo cardiaco.

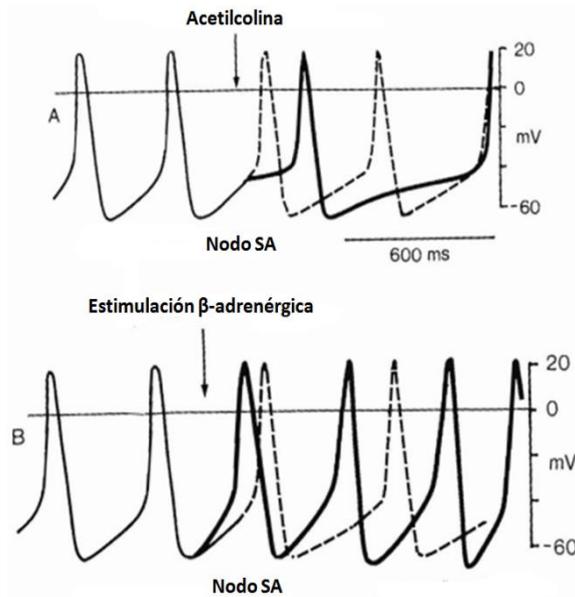


Figura 1.11 La parte superior de la figura muestra el efecto que produce el incremento del tono vagal al inhibir el nodo SA. La citada estimulación produce una corriente de salida de potasio y como consecuencia hiperpolariza el potencial de reposo, de manera que se necesita un mayor tiempo para alcanzar el umbral de activación del potencial de acción. También puede observarse un aplanamiento (disminución de la pendiente) de la despolarización diastólica (fase 4). El resultado conjunto es un enlentecimiento de la frecuencia cardiaca, es decir, bradicardia. En la parte inferior de la figura se puede observar el efecto que produce la estimulación simpática β-adrenérgica, aumentado la frecuencia cardiaca. Obsérvese el aumento de la pendiente de despolarización diastólica. Modificado de Opie (2004).

1.2.2.4.2 Conducción.

Cuando se inicia la génesis del impulso en el nodo SA, el mismo se extiende rápidamente por las aurículas hasta alcanzar el nodo AV. Se entiende como conducción AV a la capacidad de propagar el impulso eléctrico cardiaco generado espontáneamente por las células especializadas, a lo largo de todo el corazón.

La conducción del impulso cardiaco se da a lo largo de todo el corazón, iniciándose, normalmente, en el nodo SA y difunde de forma radial por toda la aurícula derecha a lo largo de las fibras miocárdicas auriculares normales, denominándose conducción auricular. Para que el impulso nervioso pueda alcanzar los ventrículos debe pasar, necesariamente, por el nodo AV, dada la existencia de tejido conectivo que separa las aurículas de los ventrículos y que impide la conducción eléctrica (Opie, 2004).

El nodo AV posee una gran heterogeneidad electrofisiológica causada por la irregularidades en la expresión de ciertos canales iónicos, entre ellos los de Na^+ , de Ca^{2+} , de K^+ y las uniones intercelulares (Zipes y Jalife, 2006). Esto, junto con peculiaridades anatómicas del nodo AV, hace que la conducción a su través resulte un tanto diferente, ya no solamente en heterogeneidad sino también en velocidad.

Una vez el impulso eléctrico alcanza el nodo AV (localizado en la aurícula derecha debajo del origen de la válvula tricúspide); continúa a lo largo de Haz de His y de sus ramas izquierda y derecha. De aquí el impulso se transmite a la red de Purkinje que queda como responsable de continuar con la conducción del impulso eléctrico cardiaco al miocardio ventricular.

Desde el momento en que el estímulo eléctrico cardiaco penetra en las ramas del haz en el tabique ventricular hasta que alcanza las terminaciones de las fibras de Purkinje, el tiempo total transcurrido es de unos 0,03 s por término medio; por tanto, una vez que el impulso cardiaco entra en el sistema de Purkinje, se disemina casi inmediatamente a la totalidad de la masa muscular ventricular izquierda y derecha (Guyton, 2006).

Una vez llegado el impulso a los ventrículos la corriente se propaga de una célula a otra gracias a que el miocardio ventricular se comporta como un sincitio funcional y las corrientes iónicas fluyen de una célula a otra prácticamente sin resistencia. En cuanto a la manera en que se propaga dicho impulso se debe a una propiedad que posee el miocardio, denominada anisotropía.

En lo que respecta a los efectos que el SNA parasimpático provoca en la conducción, destacar que en el caso de la conducción AV los nervios colinérgicos proporcionan estímulos inhibidores que producen una respuesta dromotrópica negativa (Opie, 2004). Con la estimulación vagal, varios mecanismos se combinan para en última instancia inhibir la corriente de entrada de calcio. En primer lugar, tal y como sucede en el caso del nodo SA, la interacción con las proteínas G inhibe la formación de AMPc y abre los canales de K^+ , lo cual tiende a cerrar los canales de Ca^{2+} (Opie, 2004) Además, se estimula a la óxido nítrico sintasa para formar óxido nítrico, que a su vez promueve la formación de GMPc y éste tiende a cerrar los canales de Ca^{2+} . Los efectos de los mecanismos inhibitorios son más pronunciados cuando existe una estimulación adrenérgica concurrente, como ya hemos comentado anteriormente.

Al igual que hemos comentado para el automatismo, el bloqueo de receptores M_2 con atropina en corazones aislados de conejo, no produjo modificaciones en la conducción AV intrínseca (Zarzoso, 2011).

En el caso de la activación del sistema nervioso simpático se encuentra asociada a un efecto dromotrópico positivo. Así, las catecolaminas producen un aumento en la velocidad de la fase de despolarización y también en la amplitud del potencial de acción, lo cual va en consonancia con su efecto sobre la corriente lenta de entrada de calcio, I_{Ca-L} (Scheinman, 1993), como también hemos comentado en el apartado de automatismo.

1.2.2.4.3 Refractoriedad.

La excitabilidad miocárdica sufre modificaciones a lo largo del tiempo durante la ocurrencia de un PA. La excitabilidad o batmotropismo es una de las propiedades eléctricas cardíacas que hace referencia a la capacidad que tienen las células para despolarizarse y generar un potencial de acción ante la llegada de una corriente despolarizante.

En la siguiente figura se pueden ver las diferentes fases del potencial de acción con sus correspondientes corrientes implicadas tanto en las células auriculares como en las ventriculares de trabajo.

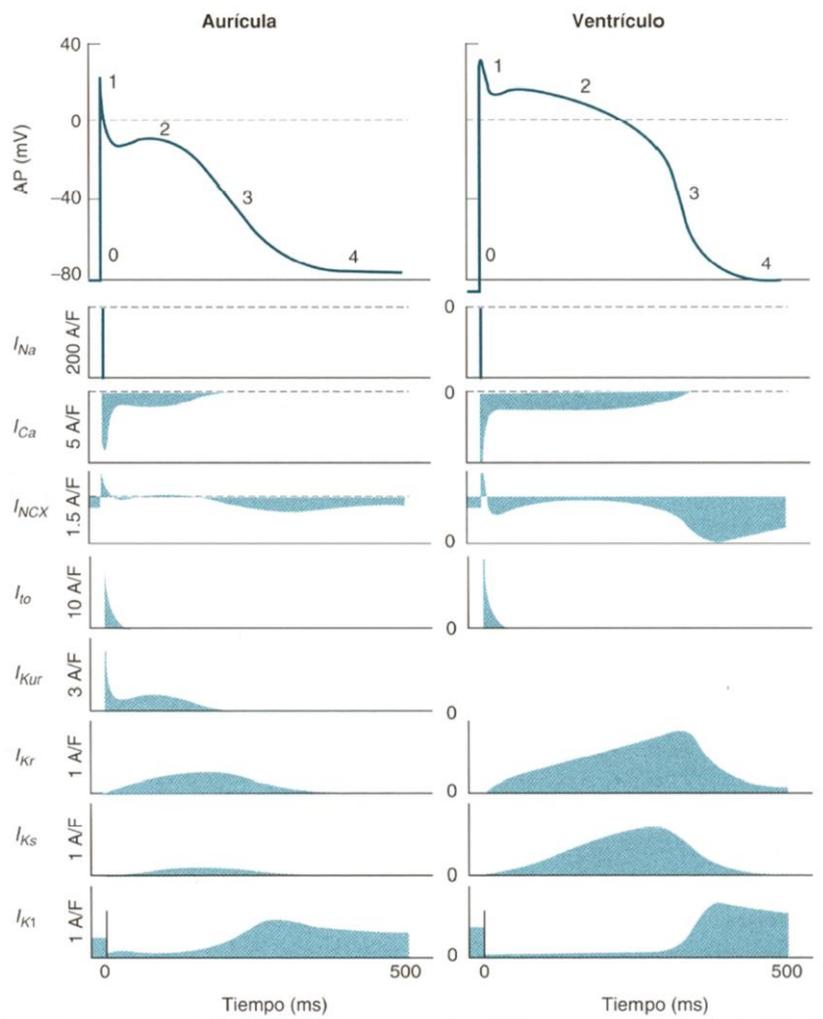


Figura 1.12 Fases del potencial de acción y de reposo cardíaco y corrientes implicadas en las células auriculares (izquierda) y ventriculares (derecha). Puede observarse la diferente morfología del PA entre ambos tipos celulares. El PA ventricular normalmente tiene una mayor duración, un potencial más positivo en la fase de meseta (fase 2) y un potencial de membrana de reposo más negativo (fase 4). La presencia de una corriente de potasio rectificadora retardada ultrarrápida (I_{Kur}) en los miocitos auriculares contribuye a la menor fase de meseta del PA auricular. La corriente de entrada de potasio rectificadora (I_{K1}) de las células ventriculares permite que haya una repolarización de fase 3 más rápida y un potencial de membrana en reposo más negativo (fase 4) (Zipes y Jalife, 2006).

El potencial de acción en las células miocárdicas de trabajo está compuesto por las siguientes fases:

- La primera fase (o fase 0), corresponde a la despolarización rápida de la célula, registrándose una variación desde el valor de potencial electronegativo propio del reposo, -90 mV, hasta aproximadamente +20 mV (figura 1.12). Se caracteriza por una pronunciada pendiente de subida ($dV/dt = 393$ V/s) (Kléber y Rudy, 2004) y se debe, fundamentalmente, a la activación de la corriente rápida de entrada de Na^+ (I_{Na}), que se inactiva cuando la diferencia de potencial (aproximadamente a +30 mV) se va aproximando al potencial de equilibrio del Na^+ (+61 mV) y dura entre 1 y 2 ms. Aunque esta corriente de entrada de Na^+ se ha relacionado solamente con la despolarización de las células miocárdicas no marcapasos, recientemente ha sido identificada una corriente de entrada rápida de este ion en las células del nodo sinusal (Lei y cols., 2007).
- La fase 1 del PA o la también denominada fase de repolarización rápida, se da como consecuencia, independientemente de la inactivación de la I_{Na} , de la activación de la corriente transitoria de salida de K^+ (I_{to}), lo que depleciona de cationes el interior celular.
- La fase 2 o la también denominada fase de meseta del PA, el potencial se mantiene aproximadamente constante y se debe a la activación voltaje dependiente de la corriente de entrada de Ca^{2+} a través de los canales que vehiculan la corriente $I_{\text{Ca-L}}$. Su duración es de unos 200 ms en las células ventriculares humanas. Esta corriente se activa cuando el potencial de membrana alcanza unos -25 mV y provee una corriente despolarizante que mantiene la meseta contra la acción repolarizante de las corrientes I_{Kr} e I_{Ks} . En el caso de las aurículas humanas y caninas, así como en el

corazón de los ratones y de las ratas, existe una corriente adicional, la I_{Kur} , que se activa más rápidamente que la I_{Kr} (Roden y cols., 2002).

- La fase 3 o fase de repolarización aumenta la velocidad de repolarización hasta que el potencial de membrana alcanza el valor propio del potencial de reposo. Se debe a la inactivación de la I_{Ca} , a la máxima activación de las corrientes de salida de K^+ de rectificación tardía (I_{Kr} e I_{Ks}) y a la activación de la corriente de rectificación interna (I_{K1}) en la fase final. También participa en el PA la activación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , que normalmente produce una extracción de tres iones Na^+ e introducción de un ión Ca^{2+} , tras la activación de la I_{Ca-L} se invierte su acción y ejerce un efecto electrogénico positivo que prolonga algo la duración del PA al final de la meseta, ya que en este caso extrae un ión Ca^{2+} por cada tres iones Na^+ que introduce. Su duración aproximada es de 100 ms.

- La fase 4 o fase de reposo, en esta fase intervienen la corriente de rectificación interna (I_{K1}), responsable de mantener el potencial de reposo cerca del potencial de equilibrio para el K^+ y el intercambiador Na^+/K^+ , bomba dependiente de ATP que genera una corriente iónica ($I_{Na/K}$) al expulsar iones Na^+ de la célula e introducir iones K^+ . Esta fase se define y se da por la diferencia de potencial existente entre el interior y el exterior de una célula en condiciones de reposo.

A lo largo del potencial de acción el miocardio sufre variaciones de excitabilidad, es por ello que podemos distinguir diversos periodos de tiempo con diferente excitabilidad (figura 1.13). En 1969, Hoffmann (citado por West en 1998), describió que:

El período refractario absoluto (PRA) puede determinarse en la célula aislada y constituye el intervalo de tiempo durante el cual la membrana no puede ser reexcitada por un estímulo externo, con independencia de la carga eléctrica comunicada. Por tanto, el estímulo no es capaz de producir una respuesta propagada. En las redes celulares, el PRA no puede determinarse con exactitud debido a los diferentes tiempos de recuperación de las diversas células en la red y generalmente, se determina el periodo refractario efectivo (PRE) para estas redes celulares.

El período refractario efectivo (PRE) de una célula o red celular constituye el intervalo de tiempo durante el cual sólo puede producirse una respuesta local para un estímulo despolarizante de mayor intensidad a la normal. Así, durante el período refractario efectivo, la membrana puede responder, pero no puede generar un PA propagado que transporte el impulso a través de toda la red celular. Este período incluye el período refractario absoluto.

El período refractario relativo (PRR) empieza al final del PRE y constituye el intervalo de tiempo tardío en el PA durante el cual puede generarse un potencial de acción propagado con un supraestímulo.

Se denomina periodo refractario funcional (PRF) de la fibra, al intervalo más corto que puede separar dos respuestas normalmente propagadas.

El periodo de tiempo durante el cual la célula es más excitable de lo normal, es decir, que con un mínimo estímulo despolarizante se puede iniciar un PA propagado, se le denomina periodo supernormal (PSN).

El periodo de recuperación total (PRT) constituye el intervalo de tiempo desde el comienzo del PA hasta el final del periodo supernormal.

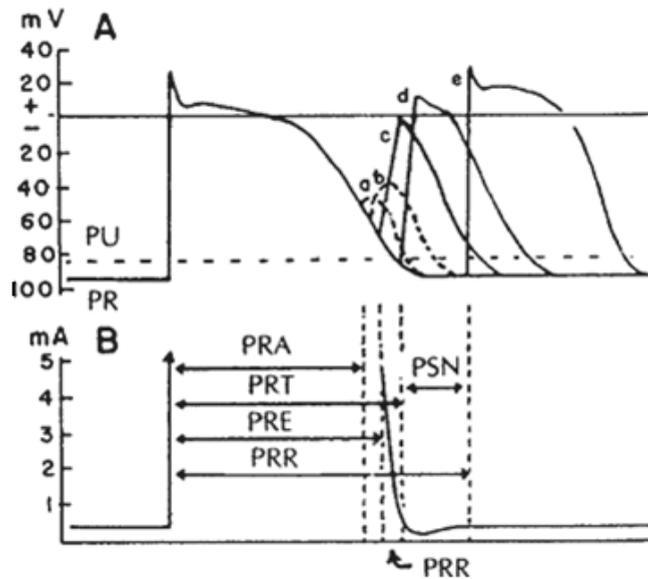


Figura 1.13 (A) PA de membrana normal y respuestas a una serie de estímulos aplicados durante y al final de la repolarización y después de ella. (B) Duraciones aproximadas del periodo refractario absoluto (PRA), periodo refractario total (PRT), periodo refractario efectivo (PRE), periodo de recuperación total (PRT), periodo supernormal (PSN) y periodo refractario relativo (PRR). Modificado de West (1998).

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

Los mecanismos iónicos de la refractariedad miocárdica los comentamos a continuación:

El PRA ocurre porque una vez el PA se ha producido, no se dispone de más corrientes activas de entrada para conseguir despolarizar la membrana. Los canales de Na^+ comienzan a inactivarse, y por tanto a no conducir, durante la despolarización. Desde la inactivación, se requiere un período de recuperación para que estos canales puedan comenzar a conducir de nuevo (Jalife y cols., 2009).

El PRE, como ya se ha dicho, se extiende desde el comienzo de la despolarización hasta que la membrana se ha repolarizado a un nivel de -50 mV y ocurre porque el movimiento de entrada de Na^+ es prácticamente nulo (Jalife y cols., 2009).

El PRR se produce al avanzar la repolarización, cuando la diferencia de potencial de membrana disminuye de -60 a -70 mV y entonces, como ya se ha comentado, puede producirse un PA propagado. A este nivel de diferencia de potencial de membrana, la tasa de movimiento de entrada de Na^+ es tan lenta que es necesaria una intensidad de corriente mucho mayor para que el movimiento de entrada de Na^+ alcance la suficiente rapidez para generar el PA, que será de menor voltaje. Además, existe un movimiento de salida de iones de K^+ a través de la membrana durante la repolarización, el cual tiende a contrarrestar los efectos de la corriente de entrada de Na^+ (Mountcastle, 1974).

El período de supernormalidad ocurre, en parte, porque el potencial de membrana retorna a los niveles de reposo, en el tiempo en el que suficientes

canales de Na^+ son reactivados y el umbral para la activación está suficientemente cercano al normal (Jalife y cols., 2009).

En cuanto a los efectos del SNA sobre la refractariedad, destacaremos los efectos sobre la refractariedad ventricular, dado que son objeto de debate y están en mayor relación con nuestro estudio.

Diversos autores han otorgado poca relevancia al control parasimpático vagal de los ventrículos (Randall y cols., 1991), en contraste con otras investigaciones de las que parece desprenderse una participación parasimpática significativa en la función ventricular (Rardon y Bayley, 1983).

Asimismo, la importancia del tono parasimpático de reposo sobre la refractariedad ventricular ha sido planteada desde hace relativamente poco tiempo (Prystowsky y cols., 1979). Farges y cols. (1977) relataron que la ACh acortó el período refractario de las fibras musculares auriculares, pero no modificó la refractariedad en el tejido miocárdico ventricular. Solamente se produjo una disminución paralela del período refractario auricular y ventricular con la administración de isoproterenol, un agonista β -adrenérgico. Por otro lado, estudios posteriores como el de Prystowsky y cols. (1979) observaron que la eliminación del tono vagal con atropina tenía un efecto significativo sobre el acortamiento de la refractariedad ventricular, incluso en presencia del bloqueo β -adrenérgico, sugiriendo un efecto directo de la ACh en el incremento de la refractariedad ventricular. Resultados similares fueron obtenidos por Morady y cols. (1988), en un trabajo realizado en humanos, observaron que la administración de atropina acorta el período refractario efectivo y funcional ventricular, no sólo tras bloquear el sistema adrenérgico con propranolol sino también tras la administración de

diferentes dosis de isoproterenol, siendo mayor el acortamiento de la refractariedad cuanto mayor era la dosis de isoproterenol. De este modo, estos autores concluyeron que el tono vagal alarga el período refractario ventricular, incluso en ausencia de una actividad simpática de fondo, y que este alargamiento puede ser acentuado por la estimulación β -adrenérgica.

Ha sido publicado que en corazones procedentes de conejos sedentarios, la administración de atropina no produce modificaciones en los períodos refractarios ventriculares, auriculares o del sistema de conducción AV (Zarzoso y cols, 2012), sin embargo, un estudio clásico llevado a cabo por Prystowsky y cols. (1979) demostraba una disminución en el periodo refractario efectivo del nodo AV tras la administración de atropina, lo que aboga en favor de un efecto prolongador de la refractariedad por parte de la ACh. Como decíamos al principio de este apartado, existe controversia en cuanto al tema, y en lo que a nosotros pretendemos analizar, no hemos encontrado estudios que estudien el período refractario ventricular durante la FV.

1.2.2.4.4 Alteraciones de la función eléctrica cardíaca.

El sistema nervioso autónomo juega un papel importante en la modulación de la electrofisiología cardíaca y arritmogénesis. Se han llevado a cabo muchas investigaciones durante décadas para comprender mejor la anatomía y fisiología del sistema nervioso autónomo cardíaco y poder proporcionar evidencias para apoyar la relación existente entre el tono autónomo con las arritmias clínicamente significativas. A mediados del siglo pasado se han llevado a cabo numerosos estudios sobre el sistema nervioso autónomo cardíaco en los que se ha sido investigado la unión tan estrecha entre el cerebro y el corazón, y la complejidad que entraña (Levy, 1971;

Yuan y cols., 1994; Armour y cols., 1997), en donde la activación autónoma altera no solamente el ritmo cardiaco, conducción, y hemodinámica, sino también las propiedades celulares y subcelulares de miocitos. Además, estudios realizados alrededor de los años 50 ya demostraron el papel tan crítico del SNA cardiaco en la arritmogénesis cardiaca (Harris y cols., 1951; McEachern y cols., 1940). El tema ha cobrado recientemente mucho interés debido a la creciente evidencia que muestra que la modulación neural ya sea por la práctica de ablación o de estimulación puede controlar eficazmente un amplio espectro de arritmias cardiacas (Kapa y cols., 2010; Taggart y cols., 2011; Shen y cols., 2012).

El control autonómico del corazón se pierde con la aparición de distintas enfermedades cardiacas crónicas, produciéndose una excesiva activación de las salidas simpáticas, una disminución en la conducción central para las salidas parasimpáticas, manifestaciones clínicas adversas tales como arritmias incluyendo la muerte súbita cardiaca, y un deterioro progresivo de la función cardiaca como bomba (Malpas, 2010; Porter y cols., 1990). Dichas alteraciones en la vía de control neuronal están asociadas con ambas remodelaciones, la funcional y la anatómica, de la red neuronal del sistema nervioso cardiaco incluyendo los elementos del sistema nervioso cardiaco intrínseco. Las neuronas localizadas en los plexos sometidos a remodelación con las enfermedades cardiacas crónica, dejan un incremento en la sensibilidad a ciertos neuromoduladores, tales como la histamina, un incremento en la expresión de la óxido nítrico sintasa neuronal y son también moduladas, de forma sinérgica, por la norepinefrina y la angiotensina II (Hardwick y cols., 2009; 1995; 2012; Girasole y cols., 2011).

Muchos autores han relacionado algunas de las características de la FV con la malignidad de dicha arritmia, existiendo una relación muy estrecha entre las citadas características y la evolución de la misma. La frecuencia dominante es uno de los parámetros electrofisiológicos utilizados con el fin de poder identificar y caracterizar mejor las fases de la arritmia. Son pocos los estudios realizados acerca de la posible participación del SNA en las modificaciones de las características del trazado fibrilatorio. Nuestro grupo realizó un estudio acerca de la posible participación del sistema nervioso parasimpático sobre la frecuencia dominante de la FV en animales sometidos a un protocolo de entrenamiento. En ese trabajo se observó un claro descenso de la frecuencia dominante en los corazones de los animales entrenados pero se descartó la dependencia de mecanismos nerviosos intrínsecos en estos cambios y por tanto, descartándose así la participación del sistema nervioso parasimpático en esta modificación (Zarzo, 2011).

En la presente tesis doctoral se han querido analizar más parámetros para poder caracterizar mejor la FV y averiguar si es el sistema nervioso intrínseco el responsable de los cambios que se producen como consecuencia de la realización de ejercicio físico de forma regular en los otros parámetros que caracterizan al trazado fibrilatorio.

1.2.3 Consideraciones sobre el uso del análisis de la fibrilación ventricular para el estudio de las propiedades electrofisiológicas miocárdicas.

1.2.3.1 Generalidades de la fibrilación ventricular.

La fibrilación ventricular es la arritmia cardiaca más grave. Después del comienzo de la FV se produce la inconsciencia en un plazo de 4 a 5 segundos por ausencia de flujo sanguíneo cerebral, y se produce la muerte irrecuperable si no se revierte en un plazo de 1 a 3 minutos (Guyton y Hall, 2006).

Fue descrita por primera vez por Erichsen en 1842 (Chattipakorn y cols., 2005), atrayendo la atención de un gran número de investigadores durante más de un siglo. El estudio de la inducción de la FV se remonta al trabajo original de Ludwig y Hoffa en 1850 en el que se utilizaba una fuerte corriente farádica (corriente alterna muy irregular de baja frecuencia) para inducir la FV. Sin embargo, no fue hasta 1940 cuando Wigger y Wegria establecieron en un trabajo fundamental que la FV podría ser inducida cuando un estímulo prematuro fuerte se aplicaba durante un cierto período del ciclo cardiaco. Este período, conocido como "periodo vulnerable", corresponde a una porción de la onda T del electrocardiograma. El descubrimiento de la inducción de la FV por un fuerte estímulo producido durante el período vulnerable ha permitido a muchos investigadores avanzar en la comprensión de su mecanismo (Chattipakorn y cols., 2005). Y también puede ser utilizado para el estudio de la susceptibilidad miocárdica para entrar en fibrilación ventricular.

En la actualidad se sabe que la FV es una situación clínica que se produce a consecuencia de una actividad eléctrica desordenada en la que los impulsos cardiacos se originan de forma errática en el interior de la masa muscular ventricular, lo que se traduce mecánicamente en una rápida contracción de los ventrículos, descoordinada y asincrónica, lo que nos va a generar un bombeo reducido o nulo de sangre. Dicha arritmia cardiaca considerada la arritmia más letal, suele ser originada por una taquicardia ventricular (TV) que da lugar a la aparición de la citada fibrilación siendo la responsable, en la mayoría de los casos, de la muerte súbita de origen cardiaco. Esta arritmia maligna es la causa más importante de muerte súbita de origen cardiaco y la primera causa inmediata de muerte súbita cardiaca en el mundo industrializado (Zipes y Wellens, 1998). Cuando se observa la FV en un electrocardiograma, se caracteriza por un ritmo aperiódico e irregular, dando la sensación de que la activación eléctrica de los ventrículos es muy compleja y fortuita. Presentando unas ondulaciones irregulares con una morfología muy variada, amplitud y frecuencia en los complejos QRS, lo cual ha llevado a definirla como una actividad eléctrica “turbulenta” del miocardio (Jalife, 2006).

Como ya se ha sido comentado, la FV se desencadena muy frecuentemente a partir de un episodio de TV. Las TV aparecen como consecuencia de una rápida y repetitiva activación del ventrículo. Igualmente por descarga focal rápida y continuada, los frentes de ondas reentrantes, después de un episodio de inicio, pueden también ser los responsables de la activación rápida de la TV. La FV, que de forma habitual se produce como consecuencia de una forma compleja de reentrada, puede ocasionarse cuando múltiples frentes de onda reentrantes se mueven de manera simultánea,

colisionan, emergen y se ramifican a lo largo de rutas que cambian de forma constante. Cuando se da una FV reentrante, se puede observar como múltiples regiones de los ventrículos se contraen y relajan al mismo tiempo. Las contracciones ventriculares regionales asincrónicas que se producen van a reducir el gasto cardiaco casi a cero y es, como hemos dicho, la causa más frecuente de muerte cardiaca súbita (Zipes y Jalife, 2006).

El tratamiento y prevención de esta arritmia se basa en la cardioversión eléctrica, cuya eficacia se relaciona, entre otros factores, con las características de la activación miocárdica, que cambian en función del tiempo transcurrido desde el inicio de la arritmia, el deterioro metabólico, los fármacos administrados o el sustrato (miocardio ventricular).

Es por ello que hay que conocer bien la fibrilación ventricular y para ello se han llevado a cabo muchos estudios cartográficos tanto *in vivo*, en el curso de intervenciones quirúrgicas como también en corazones trasplantados que, una vez aislados, son perfundidos en sistemas Langendorff.

En lo que se refiere a la parte clínica como cita Such-Miquel y cols. (2013), se han realizado muchas investigaciones con el fin analizar y conocer las características de la FV para poder predecir la dificultad para revertir la arritmia y la recuperación mecánica cardiaca. Por otro lado, este tipo de análisis de las características de la activación durante la FV a nivel experimental permite describir efectos de diversos factores sobre los mecanismos de inicio, perpetuación y cese de la FV, cruciales para el tratamiento y la prevención de la citada arritmia (Zaitsev y cols., 2003).

En la aparición de las arritmias ventriculares intervienen tanto las características del sustrato como las acciones de determinados iniciadores o disparadores como las de diversos factores moduladores son los responsables de la aparición de arritmias ventriculares. Un ejemplo de alteración del sustrato son las cicatrices formadas como consecuencia de un infarto de miocardio, haciendo posible la existencia de circuitos que sustentan las TV y cuya inestabilización lleva a la temida FV. De entre los iniciadores o disparadores responsables del comienzo de la arritmia se encuentran las extrasístoles ventriculares y los cambios de frecuencia. Los dos factores se encuentran modulados por diversos mecanismos que pueden favorecer que aparezca la arritmia o desestabilizar los patrones regulares de activación miocárdica. Uno de los factores moduladores más estudiados es el sistema nervioso autónomo que da lugar a alteraciones dinámicas tanto del sustrato como de los iniciadores, modificando así la probabilidad de inducción de la arritmia (Zipes y Wellens, 1998; Zipes, 2008).

En cuanto a los mecanismos que sustentan la fibrilación una de las descripciones cuantitativas clásicas se basa en la heterogeneidad de la refractariedad miocárdica que determina una propagación irregular de los frentes de activación por aparición de bloqueos unidireccionales que conducen a la reactivación de zonas previamente activadas en el mismo proceso, dando lugar a múltiples pequeñas ondas simultáneas e independientes que se desplazan por vías aleatorias siempre cambiantes a través del miocardio (Moe y cols., 1964), lo que hace que la medida de este parámetro, la heterogeneidad, durante la propia FV como pretendemos en nuestro estudio, sea tan importante para un mayor conocimiento de la arritmia. El análisis de la actividad reentrante ha sido abordado desde

distintas aproximaciones, sugiriendo por una parte el papel determinante de la presencia de periodicidades espaciotemporales originadas por activaciones reentrantes persistentes, denominados rotores, que son los responsables de la excitación cardíaca, constituyendo los posibles centros organizadores subyacentes al mecanismo que sostiene la FV (Gray y cols., 1998). O bien, por otra parte, el papel predominante de fraccionamiento de los frentes de activación como mecanismo responsable de la perpetuación del proceso durante la fibrilación. Existe una hipótesis denominada hipótesis de la restitución que amplía los dos conceptos anteriores enfatizando el hecho de que la dispersión espacial de la duración del potencial de acción y de la velocidad de conducción es proarritmogénica ya que favorece la rotura de los frentes de activación y que en esta dispersión es en donde intervienen los cambios de la frecuencia y las activaciones precoces (Weiss y cols., 1999; Weiss, 2004).

Diversos factores pueden propiciar el desencadenamiento de la FV. Entre ellos citaremos a la dispersión o heterogeneidad del periodo refractario como uno de los factores bastante contribuyente a la FV (Janse y Wit, 1989). Otros factores son los que contribuyen al mantenimiento y perpetuación de la misma, como la complejidad del proceso de activación miocárdica, el tiempo de activación eléctrica, entre otros.

1.2.3.2 Métodos de análisis de la fibrilación ventricular. Estudio de otros parámetros electrofisiológicos.

La manera en la que analizar la activación ventricular durante la FV es muy compleja, debido a las características de la arritmia y a las limitaciones de las técnicas utilizadas para su estudio, ha tenido que ser abordada

utilizando métodos y técnicas diversas, entre los que se encuentran el análisis de las características del ECG, registros endocárdicos intracelulares o de los potenciales de acción monofásicos, el análisis de las características espectrales de las señales fibrilatorias, los estudios basados en técnicas cartográficas y la utilización de simulaciones mediante ordenador (Moe y Mendez, 1962; Carlisle y cols., 1990; Abildskov, 1994; Cha y cols., 1994; Allesie y cols., 1996; Stewart y cols., 1996; Lee y cols., 1996; Chorro y cols., 1998; Kwan y cols., 1998; Gray y cols., 1998; Rogers y cols., 1999).

Entre las técnicas empleadas se encuentra la cartografía epicárdica de la activación ventricular mediante electrodos múltiples mediante los que se registran potenciales extracelulares (Cha y cols., 1994; Lee y cols., 1996; Rogers y cols., 1999), o sistemas de mapeo óptico basados en la utilización de marcadores sensibles a los cambios de voltaje en los que las variaciones en la fluorescencia de la señal indican los cambios del potencial transmembrana de grupos de células próximas entre sí (Zhou y cols., 1995; Witkowski y cols., 1998; Gray, 1999; Efimov y cols., 1999), han podido aportar información muy valiosa acerca de las características de la activación miocárdica durante las arritmias ventriculares. El conocimiento y utilización de dichas técnicas han supuesto el soporte metodológico de diversos trabajos sobre la FV en los que se han objetivado los patrones de activación y la existencia de activación reentrante, tanto en el inicio de la arritmia como durante la evolución de la misma (Cha y cols., 1994; Lee y cols., 1996; Kwan y cols., 1998; Witkowski y cols., 1998; Weiss y cols., 1999; Rogers y cols., 1999; Chorro y cols., 2000), siendo más limitada la información disponible sobre su cese mediante procedimientos distintos a la desfibrilación eléctrica (Cha y cols., 1994).

Uno de los métodos clásicos de estudio de la fibrilación ventricular, ha sido el análisis de los trazados en el dominio de la frecuencia. En el espectro de frecuencias los componentes principales de las señales fibrilatorias se agrupan en bandas alrededor de valores definidos que se pueden identificar con facilidad y permiten caracterizar mejor las fases evolutivas de la arritmia. Con ello se conseguía información de parámetros como la frecuencia dominante, tanto media, máxima y mínima. Son innumerables los estudios que han seguido esta metodología, incluyendo algunos realizados por nuestro grupo de trabajo (Such y cols., 2008; Zarzoso y cols., 2012). Mediante estos estudios, como hemos citado, ha podido establecerse entre otras conclusiones, que la frecuencia dominante de la FV es modificada por el ejercicio físico y que esta modificación no es dependiente de la acción colinérgica en corazón aislado. Quizá estos estudios sean los únicos que relacionan fibrilación ventricular, ejercicio físico y sistema nervioso parasimpático intrínseco. No obstante, los autores no analizaron otros parámetros de interés como los que desarrollamos a continuación en este punto.

También es posible realizar estudios de la fibrilación ventricular en el dominio del tiempo, en donde se puede conseguir información acerca de parámetros como la mediana de los intervalos VV, además de poder determinar el periodo refractario durante la fibrilación ventricular.

La información proporcionada por las técnicas espectrales y la obtenida mediante la determinación de parámetros en el dominio del tiempo, proporcionan información superponible (Chorro y cols., 2000) y son instrumentos muy útiles para poder caracterizar las acciones de fármacos u otros procedimientos terapéuticos.

Otros parámetros electrofisiológicos de estudio relacionados con la fibrilación ventricular son los siguientes:

La inducibilidad de la FV, que como se señala en la revisión de Jalife (2000), son ya clásicas las investigaciones de Han y Moe (1964), en las que se efectuaron una serie de experimentos para comprobar los efectos de varios agentes farmacológicos sobre el período refractario del músculo ventricular, estableciendo la importancia de la heterogeneidad en el período refractario para la inducción de FV. Es el incremento de la heterogeneidad es responsable de la aparición de bloqueos en la conducción, dispersión espacial de la repolarización etc. (Kléber y Rudy, 2004), lo que a su vez facilita la aparición del fenómeno de la reentrada y las arritmias ligadas al mismo.

El estudio del proceso de la activación eléctrica del corazón durante la FV, reviste especial interés no solamente desde el punto de vista fisiopatológico sino también por lo que supone de aproximación indirecta al conocimiento de ciertas propiedades electrofisiológicas del miocardio. Las alteraciones en el patrón de activación miocárdica durante el proceso de la fibrilación ventricular pueden estar ligadas a modificaciones electrofisiológicas que afectan a la duración del potencial de acción, al potencial de acción monofásico y a la refractariedad.

Todos estos parámetros que acabamos de mencionar, dan información acerca, básicamente, de propiedades eléctricas intrínsecas miocárdicas si el estudio es en órgano aislado como es nuestro caso, por lo que cualquier modificación de los mismos por determinadas maniobras (variaciones autonómicas o ejercicio físico entre otras), nos estarán dando información de cómo esas maniobras operan en el miocardio. Dado que algunas de estas

propiedades solamente pueden ser estudiadas durante la fibrilación ventricular, podemos afirmar que en nuestro estudio estamos utilizando como herramienta a la propia fibrilación ventricular, con el ánimo, repetimos, de acercarnos más al conocimiento de esas propiedades electrofisiológicas como son la heterogeneidad, complejidad, tiempos de activación miocárdicos y también, por qué no, a la propia refractariedad.

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

Se sabe que el ejercicio físico aeróbico puede proteger contra la muerte súbita cardíaca, que en la mayoría de los casos se produce por fibrilación ventricular (Billman, 2002; 2006), pero los mecanismos concretos subyacentes por los que se producen los efectos protectores cardiovasculares, como acabamos de analizar, no se conocen por completo. En lo que respecta a ésta investigación se ha llevado a cabo con el fin de dilucidar si las modificaciones electrofisiológicas producidas por el entrenamiento podrían representar un posible mecanismo protector. En la literatura se pueden encontrar artículos que han demostrado que el entrenamiento aumenta la estabilidad eléctrica ventricular (Hull y cols., 1994), disminuye la heterogeneidad electrofisiológica en modelos caninos *in vivo* (Hajnal y cols., 2005), al menos durante la isquemia miocárdica, y aumenta el umbral de inducción de la FV durante la oclusión coronaria en corazones aislados de rata (Noakes y cols., 1983). También ha sido demostrado que el entrenamiento físico aumenta la refractariedad ventricular en conejos entrenados (Such y cols., 2008, Zarzoso y cols., 2012). Más efectos electrofisiológicos producidos por el entrenamiento han sido recientemente investigado (para revisión ver Billman, 2009). Sin embargo, a pesar del gran número de estudios sobre la participación del sistema nervioso

extrínseco en las modificaciones electrofisiológicas producidas por el entrenamiento, hay menos conocimiento sobre la influencia directa de las neuronas colinérgicas intrínsecas del miocardio en las modificaciones electrofisiológicas debido al entrenamiento físico. Se quiere investigar en el presente trabajo el efecto del ejercicio físico crónico sobre la refractariedad ventricular y su dispersión espacial, la complejidad de la activación miocárdica durante la fibrilación ventricular y la vulnerabilidad ventricular, que son parámetros estrechamente relacionados con una arritmia reentrante mantenida, como es la fibrilación ventricular. También hemos investigado la participación directa de las neuronas colinérgicas del miocardio en las modificaciones de estos parámetros.

A la vista de lo expuesto, nuestra hipótesis es que el ejercicio físico crónico muestra efectos protectores sobre el miocardio y por tanto, aumenta la refractariedad ventricular, disminuye la heterogeneidad electrofisiológica y la complejidad de la activación miocárdicas y hace menos vulnerable al miocardio a la aparición de la fibrilación ventricular; participando las neuronas colinérgicas intrínsecas del miocardio en estos efectos.

1.4 Plan de trabajo.

Para poder alcanzar los objetivos de la presente tesis doctoral, hemos diseñado un plan de trabajo constituido por las siguientes tareas a desarrollar y que nombraremos por orden cronológico:

1. Diseño experimental y cronograma de los experimentos junto con el del protocolo, tanto el de entrenamiento físico como el electrofisiológico.
2. Aplicación del protocolo de entrenamiento físico en cinta rodante diseñado con anterioridad, solamente en un grupo de

animales que denominaremos entrenados. Los otros dos grupos de estudio, tanto el grupo control como el falso operado, serán estabulados en las mismas condiciones y durante el mismo periodo de tiempo que el grupo de animales entrenados, pero sin someterlos a ningún protocolo de ejercicio físico.

3. Una vez finalizado el periodo de estabulación, se realizará la preparación experimental, que nos permitirá aislar los corazones de los tres grupos de estudio.

4. Tras la ubicación y perfusión del corazón en el sistema de tipo Langendorff, se aplicará el protocolo electrofisiológico para poder estudiar los diferentes parámetros que son objeto de estudio en la presente tesis doctoral durante fibrilación ventricular.

5. Una vez realizados los experimentos, procesaremos los registros obtenidos con el fin de obtener la información de los parámetros de estudio.

6. Posteriormente, procederemos al análisis estadístico y realizaremos las comparaciones entre los tres grupos experimentales y entre distintas situaciones dentro del mismo grupo. Todo ello nos permitirá extraer las conclusiones que expresaremos al final de este manuscrito.

Capítulo 2

MATERIAL
Y MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Animales de experimentación: características.

El presente estudio ha sido realizado en corazones aislados, con un peso medio de $14,26 \pm 2,02$ g y un flujo inicial de $47,43 \pm 16,70$ ml/min, procedentes de conejos macho, de raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), alimentados *ad libitum* y con un peso medio al inicio del periodo de estabulación de $2,02 \pm 0,11$ Kg y peso final de $3,58 \pm 0,34$ Kg. Estos animales son criados y facilitados por la Granja San Bernardo S.L. Llegan al animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València con una edad de 9 semanas. A continuación, son estabulados durante un periodo de 7 semanas bajo unas condiciones de estabulación controladas y constantes tanto de temperatura, entre 21-23°C, como de humedad relativa, siendo del 31%, como el control en los ciclos de luz, alternando la artificial con la oscuridad.

2.1.2 Reactivos.

A continuación agrupamos los reactivos en función de su finalidad:

- Preparar la solución de Tyrode: CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , NaH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl y glucosa de Panreac[®] Química S.A.
- Anestesiarse al animal: Ketamina (Ketolar[®]) de Parke-Davis.
- Heparinizar al animal: heparina sódica al 5% de Rovi[®].
- Bloquear los receptores muscarínicos intracardiacos: atropina (atropine sulfate monohydrate) de Sigma-Aldrich Química[®].

2.1.3 Dispositivos.

2.1.3.1 Para pesaje.

Balanza Precisión (Precisa Balances[®]), modelo *GF-2000*, y balanza Soehnle[®].

2.1.3.2 Para entrenamiento.

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



Figura 2.1 Tapiz rodante y unidad de control.

2.1.3.3 Otros.

Bomba de infusión KDS100 (KD Scientific, EE.UU) (figura 2.2), que fue utilizada para infundir atropina, de forma continua y a una concentración constante, a través de la raíz aórtica del corazón.



Figura 2.2 Bomba de infusión KDS-100.

Desfibrilador, diseñado en la Universidad Politécnica de Valencia gracias a un proyecto de colaboración con el grupo de bioingeniería del instituto ITACA (BioITACA). Compuesto por: una unidad de control y dos palas circulares de metal con un diámetro de 20 mm, se conectan a la unidad de control y son colocadas directamente en la superficie epicárdica del corazón para aplicar el choque. El desfibrilador permitía regular la energía del choque eléctrico ajustable entre 2-10 J y el tipo de onda aplicado en la descarga (monofásica o bifásica) (figura 2.3).



Figura 2.3 Desfibrilador manual.

2.1.4 Sistemas y programas informáticos.

2.1.4.1 Sistema de perfusión del corazón.

El sistema de perfusión está compuesto por un sistema de soporte metabólico tipo Langendorff, una bomba peristáltica (Cole-Parmer[®] Instrument Co[®].) y de una bomba circulante de termostatación (Neslab[®] Instrument, Inc[®].) que mantiene caliente, a unos 40°, el agua destilada que circula por la cámara externa de la doble camisa del sistema (figura 2.4).

El objetivo básico del método Langendorff es proveer al corazón aislado del oxígeno, la temperatura y los metabolitos necesarios por medio de una cánula insertada en la aorta ascendente. El líquido nutricio es impulsado a través de la aorta en el sentido contrario al de la circulación sanguínea. Esta perfusión retrógrada de la aorta cierra las válvulas aórticas y fuerza la circulación del fluido por las arterias coronarias durante el período diastólico, como ocurre en el ciclo cardiaco normal. El líquido continúa entonces a través del sistema coronario y tras irrigar a los tejidos cardiacos, sale por el ostium del seno coronario en la aurícula derecha. El flujo coronario necesario depende del tamaño del corazón y se encuentra en torno a 30 ml por minuto en corazones aislados de conejo adulto. Con esta técnica, las cámaras izquierdas del corazón permanecen esencialmente sin líquido, y los ventrículos se contraen contra la presión atmosférica de su interior.

El sistema está formado por diversos tubos y cámaras de vidrio, por los que circula el líquido de perfusión, denominado Tyrode, antes de llegar a la cánula de inyección. Este líquido nutricio ha sido impulsado desde un depósito exterior, en el cual se realiza la oxigenación y ajuste de pH, gracias a la utilización de una mezcla de gases, concretamente oxígeno y dióxido de

carbono, denominada carbógeno, hasta la parte más elevada por medio de una bomba peristáltica, habiendo pasado previamente por un filtro y un depósito de calentamiento (figura 2.4). La presión de perfusión ha sido controlada manualmente mediante un manómetro integrado en el sistema.

La siguiente representación esquemática corresponde a una preparación de corazón aislado de conejo, que como hemos descrito en este apartado consta de un sistema de perfusión, de estimulación y de registro:

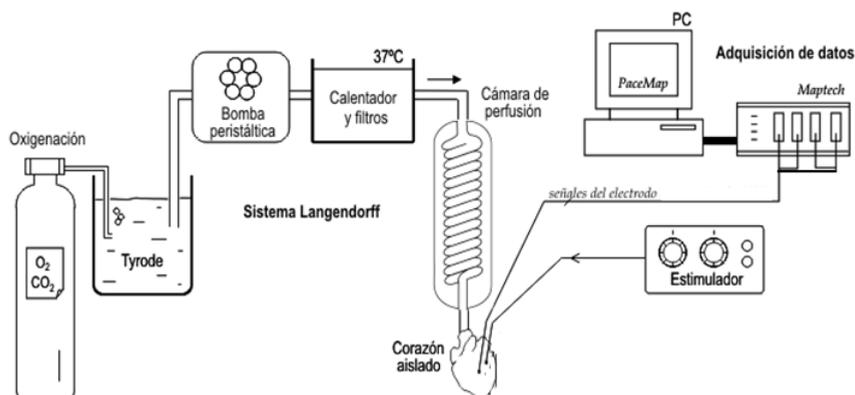


Figura 2.4 Representación esquemática del sistema experimental: preparación, sistema Langendorff, elementos de registro y estimulación, e instrumentación.

2.1.4.2 Sistema de registro.

Consta de los siguientes elementos:

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

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



Figura 2.5 Electrodo múltiple de registro.

Ambos electrodos se conectaron a un sistema cartográfico que definimos a continuación.

Sistema de cartografía epicárdica de la actividad eléctrica (MAPTECH®, Waalre, Holanda), para la adquisición y digitalización de las señales correspondientes a los electrogramas. Los electrogramas se amplificaron con una ganancia de 100 a 300, se filtraron eliminando las frecuencias situadas fuera de la banda comprendida entre 1-400 Hz y se multiplexaron. La frecuencia de muestreo en cada canal fue de 1 kHz, con una resolución de 12 bits. Los registros obtenidos a lo largo del experimento fueron almacenados en un soporte digital preparado para la adquisición y registro de la actividad eléctrica cardiaca con el fin de poder realizar el posterior análisis de las señales adquiridas (figura 2.6).



Figura 2.6 Sistema de cartografía MapTech®.

En la figura 2.7, podemos observar la ubicación real de los diferentes electrodos, tanto los de registro como los de estimulación, para llevar a cabo los experimentos.

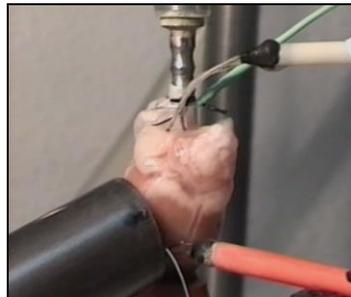


Figura 2.7 Colocación de los electrodos: electrodo de registro auricular; electrodo de estimulación auricular; placa multielectrodo de registro ventricular; electrodo de estimulación ventricular.

2.1.4.3 Sistema de estimulación.

Consta de los siguientes elementos:

Electrodos bipolares de estimulación de acero inoxidable con un diámetro de 0,125 mm, y distancia interelectrodo de 1 mm, ubicados en la zona epicárdica a estudiar y conectado al estimulador.

Estimulador Grass[®], modelo S88 (Grass Instruments[®], Inc., Quincy, M.A., U.S.A.), al que se conectó el electrodo bipolar de estimulación antes citado, provisto de una unidad de aislamiento de estímulos (modelo SIU5). El estimulador permite emitir pulsos rectangulares de corriente, con un amplio rango de duraciones, pudiendo controlar parámetros tales como frecuencia de estimulación, intensidad y tiempo de duración del estímulo (figura 2.8). De este modo conseguimos una estimulación controlada, en una zona concreta, y programada gracias a un sistema computarizado que permite emitir pulsos de corriente.



Figura 2.8 Estimulador Grass[®] S88 (vista frontal).

2.1.4.4 Programas informáticos.

PaceMap[®] (año 2002) incorporado en el sistema de adquisición *MapTech*, es utilizado para la visualización, captura y análisis de los electrogramas. Este *software* permite la visualización por grupos de canales (figura 2.9) y almacenaje de los registros en el disco duro del ordenador, siendo la extracción de los episodios requeridos una tarea sencilla y rápida. Para todo ello es necesaria la utilización de las matrices de correspondencia electrodo-canal que codificarán la distribución espacial de las señales.

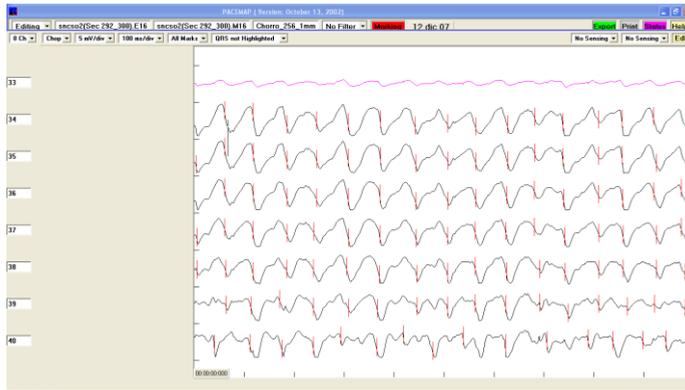


Figura 2.9 Detalle del programa *Pacemap*[®] en el que aparecen los trazados fibrilatorios epicárdicos correspondientes a 8 electrodos ventriculares de los 240 utilizables.

Matlab[®] 7.6.0 (octubre de 2008), programa que ofrece un entorno de desarrollo integrado con un lenguaje de programación propio, sobre el que se ha programado diversas aplicaciones para el tratamiento de los datos del estudio. Se programó una aplicación con el fin de realizar el análisis en el dominio del tiempo de las señales de FV y obtener los parámetros estadísticos que la caracterizan, llamada *MedMap*.

MedMap, desarrollado bajo entorno *MatLab*[®], utilizado fundamentalmente para la comprobación y validación de mapas y espectros de frecuencia de las señales de FV. También se utilizó para la visualización de los histogramas de los intervalos VV de la FV y obtención de los parámetros estadísticos (figura 2.10) a partir de un fichero ASCII de marcas extraído del *PaceMap*[®].

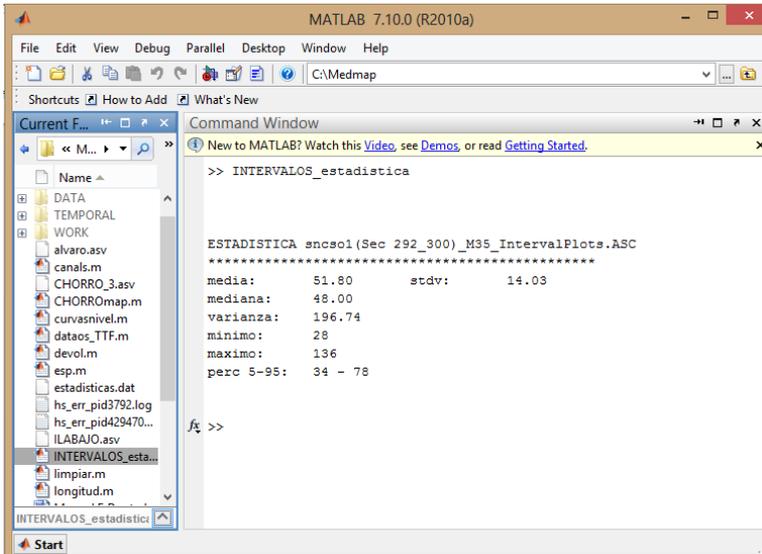


Figura 2.10 Detalle del programa Matlab® dentro de la aplicación Medmap. Aparece un ejemplo de los parámetros estadísticos obtenidos a partir de un fichero ASCII de marcas.

SPSS®, paquete estadístico empleado para la gestión de datos y el análisis estadístico de los resultados (versión 19).

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

2.2 Métodos.

2.2.1 Preparación y acondicionamiento de los animales.

Las condiciones de estabulación durante el periodo de siete semanas fueron las mismas para todos los animales empleados para este estudio.

2.2.1.1 Estabulación.

Los conejos permanecieron siete semanas en jaulas individuales de dimensiones reglamentarias, y se utilizó viruta de nogal Lignocel UBK 1500/3000 para mantenerlos en las condiciones de limpieza más adecuadas. Todos los animales estudiados fueron alimentados con agua y pienso (Harlan Teklad Global Rabbit Diet), *ad libitum*. El estado de salud de los animales fue controlado registrando diariamente el peso de los mismos y la cantidad de pienso ingerido. En la tabla 2.1 se muestra la composición detallada del pienso utilizado, aportándoles una dieta completa y equilibrada con un valor calórico de 2,4 Kcal/g.

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

<u>INGREDIENTES:</u>	<u>ADICIÓN POR kg:</u>
Harina de alfalfa deshidratada	VITAMINAS:
Salvado de trigo	Vitamina A.....15000 U.I.
Trigo	Vitamina D ₃1500 U.I.
Hojuelas de Avena	Vitamina E (α-tocoferol).....81 mg
Harina de soja tostada	Vitamina K ₃ (menadiona sodio bisulfito).....50 mg
Dextrosa	Vitamina B ₁9,8 mg
Fosfato bicálcico	Vitamina B ₂12 mg
Cloruro de sodio	Vitamina B ₆11,5 mg
Carbonato de calcio	Vitamina B ₁₂0,08 mg
Aceite de soja	Niacina.....27 mg
L-Lisina	Ácido d-pantoténico.....21 mg
D, L-Metionina	Ácido fólico.....2,9 mg
Piedra caliza (Carbonato de calcio)	Biotina.....0,23 mg
	Colina.....600 mg
<u>ANÁLISIS:</u>	MINERALES:
Agua (humedad)..12,00 %	Hierro (Sulfato ferroso heptahidratado).....50 mg
Proteína.....16,50 %	Manganeso (Sulfato de manganeso monohidratado).....44 mg
Grasa.....3,50 %	Zinc (Sulfato de zinc monohidratado).....30 mg
Fibra.....15,50 %	Cobre (Sulfato de cobre pentahidratado).....7 mg
Ceniza.....8,50 %	Cobalto (Carbonato básico de cobalto monohidratado)..0,5 mg
	Yodo (Yodato de calcio anhidro).....6,2 mg
	Cromo (Sulfato crómico).....0,5 mg

Tabla 2.1 Composición nutricional del pienso alimentario *DIET 2030 Complete feed* (Harlan Interfauna Ibérica S.A.).

2.2.1.2 Protocolo de familiarización (grupos de estudio).

Todos los conejos fueron sometidos durante una semana a un protocolo de familiarización que consistió en colocar a los conejos en la cinta rodante y, con el fin de conseguir adaptar a los animales a la dinámica de la carrera de manera natural (Such y cols., 2002), aplicarles 4 sesiones de carrera. Tras el periodo de familiarización los animales fueron distribuidos en los tres grupos de estudio, en el grupo control, en el grupo entrenado o en el grupo falso operado.

El grupo entrenado estaba formado por 11 animales que fueron sometidos a un protocolo de entrenamiento físico durante seis semanas. El grupo control lo constituyeron otros 11 animales que no participaron en el protocolo de entrenamiento y que permanecieron estabulados durante dicho periodo. Por último, el grupo de animales falsos operados, constituido por 10 animales de características similares al grupo control. La diferencia de este grupo con el control radica en una variación del protocolo experimental que será detallada en el apartado 2.2.3.

2.2.1.3 Protocolo de entrenamiento físico.

Solamente el grupo entrenado fue sometido a un periodo de entrenamiento de 6 semanas, que consistió en 30 sesiones, a razón de 5 sesiones semanales consecutivas (5 días a la semana durante 6 semanas). Cada sesión se compuso de 6 series de carrera continua durante 4 minutos, con 1 minuto de descanso entre series y una velocidad de 0,33 m/s (20 m/min). Siendo un entrenamiento diario de 29 minutos de lunes a viernes con un periodo de descanso de dos días (de sábado a domingo).

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

Tras el periodo de estabulación se procedió a la preparación experimental para realizar el estudio electrofisiológico.

2.2.2 Preparación experimental.

Los conejos se pesaron con una balanza de la firma Soehnle[®], y los corazones también, una vez concluido el protocolo, con una balanza de precisión Precisa Balances[®]. La preparación experimental puede verse en la figura 2.11. Tras la heparinización y anestesia a través de la vena marginal de la oreja, mediante una preparación de heparina sódica al 5% (800 UI), y ketamina, (12,5 mg/kg), se procedió a sacrificar al animal mediante contusión cervical. A continuación se llevó a cabo una toracotomía mediosternal y una pericardiotomía, para proceder a la extracción del corazón, seccionándolo por su pedículo vascular, y sumergiéndolo en una solución fría de Tyrode (1-5 °C), para su posterior manipulación sin deterioro metabólico del tejido cardiaco. Tras seccionar la arteria pulmonar y a continuación diseccionar la arteria aorta ascendente, ésta se seccionó también, y se conectó al sistema de Langendorff, mediante hilo de seda de entre 1-2 mm de diámetro, perfundiendo el corazón retrógradamente con la solución de Tyrode a 37 ± 5 °C, que contiene los siguientes electrolitos con sus correspondientes concentraciones (mM): NaCl:130; KCl:5,6; CaCl₂:2,9; MgCl₂:0,6; NaH₂PO₄:1,4.; NaHCO₃:25 y 12 glucosa, el pH se mantuvo a 7,4. La oxigenación se efectuó gracias a la adición de gas carbógeno y éste contribuyó al mantenimiento del pH. El carbógeno es una mezcla que está compuesta por O₂ al 95% y por CO₂ al 5%. La presión de perfusión inicial se fijó en 60 mm Hg.

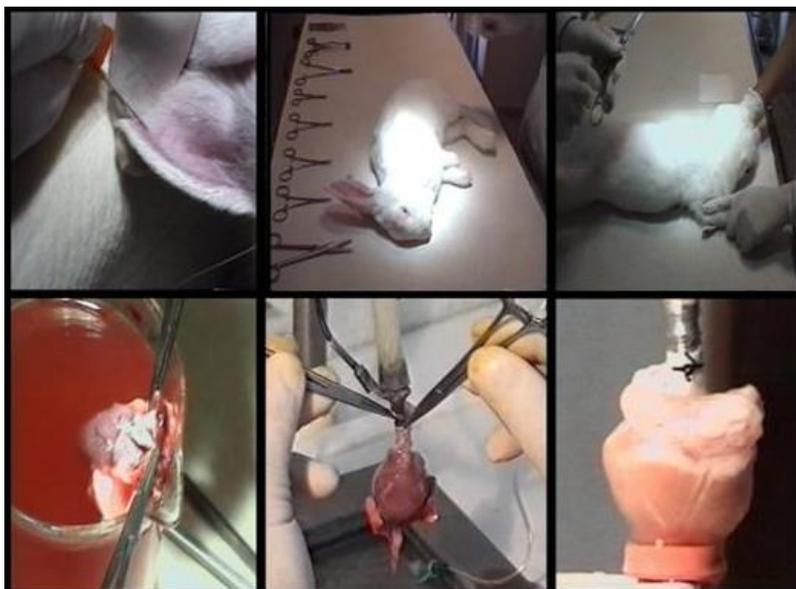


Figura 2.11 Imágenes tomadas durante la extracción y ubicación de la preparación en el sistema Langendorff. De izquierda a derecha, y de arriba abajo: anestesia a través de la vena marginal izquierda, animal anestesiado, previo a la extracción una vez sacrificado, corazón sumergido en baño de Tyrode frío, inserción de la aorta en la cánula del sistema, y preparación ya fijada al sistema.

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

El líquido de perfusión, ubicado y oxigenado en un depósito exterior, es el que le aporta al corazón los nutrientes, oxígeno y dióxido de carbono

necesarios, y es impulsado a los vasos coronarios de forma normógrada gracias a una bomba peristáltica que conduce al líquido nutricio hasta la parte más elevada del sistema de Langendorff. Tras un filtrado previo con un filtro de membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 3 μm , adecuado para evitar el paso de partículas que pudiesen causar una posible obstrucción de los vasos coronarios. Una vez introducido en el sistema tubular, el Tyrode se mantiene caliente ya que el sistema posee una doble camisa por donde pasa el agua que lo atempera, para ello empleamos una bomba circulante de termostatación, consiguiendo alcanzar la temperatura idónea de 37°C en la raíz aórtica.

En cuanto a la parte de ubicación de los electrodos nos centraremos en primer lugar en los de estimulación y más adelante en los de registro. Dispusimos los electrodos del siguiente modo (figura 2.12): se ubicó el electrodo bipolar de estimulación auricular en la aurícula izquierda, aprovechando la hendidura realizada para hacer insuficiente la válvula mitral, y fue utilizado para la realización de otro estudio electrofisiológico. El otro electrodo bipolar de estimulación se situó en la pared libre del ventrículo izquierdo, en la zona anterolateral izquierda, siendo utilizado para la inducción de la FV con estimulación a frecuencias crecientes. La estimulación se efectuó mediante un estimulador Grass S88[®] (Grass Instruments[®] Inc., Quincy, M.A., U.S.A.), que permite emitir pulsos de corriente, y que está provisto de una unidad de aislamiento de estímulos (SIU5). El electrodo indiferente se ubicó sobre la aorta canulada.

A continuación, dispusimos los electrodos de registro del siguiente modo (figura 2.12): se ubicó un electrodo bipolar revestido de plata en el Haz de Bachman para el registro del electrograma auricular que fue empleado para

otros estudios electrofisiológicos, y para el registro ventricular, que es el que emplearemos en la presente tesis, se utilizó un electrodo múltiple con 256 electrodos unipolares de acero inoxidable, colocados en la superficie epicárdica plana de la pared libre del ventrículo izquierdo. Las señales captadas por dichos electrodos de registro fueron adquiridas y digitalizadas mediante un sistema de cartografía de la actividad eléctrica cardiaca MapTech[®], como se ha comentado anteriormente, y un PC con una tarjeta de adquisición de datos y el software *PaceMap* que permite la monitorización de las señales durante el experimento y su posterior análisis para la obtención de los resultados del presente estudio.

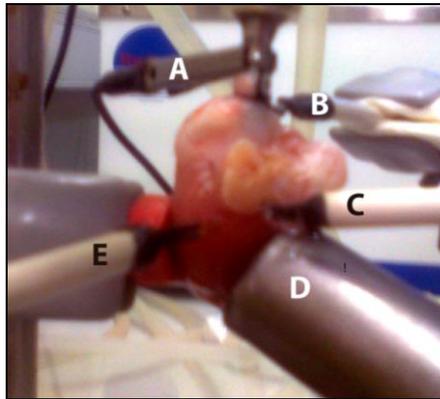


Figura 2.12 Colocación de los electrodos: A) electrodo indiferente; B) electrodo de registro auricular; C) electrodo de estimulación auricular; D) placa multielectrodo de registro ventricular; E) electrodo de estimulación ventricular

2.2.3 Protocolo experimental.

Se llevó a cabo el mismo protocolo en los tres grupos de experimentación (grupo control, entrenado y falso operado). Tras ubicar el corazón en el sistema Langendorff, se dejaron transcurrir 20 minutos para estabilizar la preparación, tiempo durante el cual se situaron los electrodos correspondientes, conectándolos a su vez a la instrumentación necesaria, tal y como ha sido descrito en el apartado anterior, y se procedió a la realización del protocolo experimental. Dicho protocolo constaba de dos partes en las que evaluamos las propiedades electrofisiológicas cardiacas a través de varias pruebas. Tras finalizar la primera fase del protocolo, se realizó una infusión continua de una disolución de atropina a una concentración constante de $1\mu\text{M}$, con el fin de bloquear la posible participación del citado sistema colinérgico intrínseco y se repitió el mismo protocolo. En ambas partes analizaremos los mismos parámetros, centrándonos en el análisis de la fibrilación ventricular, tanto temporal (intervalos de activación ventricular) como morfológico (complejidad de la activación miocárdica). Además, dichos análisis nos permiten obtener los parámetros electrofisiológicos siguientes: el periodo refractario funcional (refractariedad), el coeficiente de variación del periodo refractario funcional (heterogeneidad) y los tiempos de activación miocárdica.

Para la preparación de atropina se empleó como disolvente una solución de Tyrode filtrado, dicha solución se preparaba diariamente y se introducía en una jeringa siempre protegida de la luz, para evitar el deterioro de la preparación, a una concentración $100\mu\text{M}$ en jeringa. La infusión se realizaba a una velocidad de infusión correspondiente a la centésima parte del flujo coronario/hora. En cuanto al grupo de los animales falsos operados se les

infundió Tyrode filtrado, en lugar de la disolución de atropina, con las mismas características de infusión en lo referido al flujo. Este grupo de estudio nos sirvió para comprobar si la repetición del protocolo experimental o el transcurso del tiempo podían interferir y por tanto modificar los resultados obtenidos y así poder diferenciar estos posibles efectos con los producidos por el bloqueo colinérgico de los receptores muscarínicos.

Hay partes del protocolo que no nombraremos ya que no han sido utilizadas para este estudio, tal y como se indica en la figura 2.13 (pruebas adicionales). A continuación se describirá de forma más detallada cada una de las partes que componían el protocolo electrofisiológico utilizado (figura 2.13). Antes de iniciar el protocolo, se realizó una medida del flujo coronario, tras lo cual se procedió de la siguiente manera:

- Medida del flujo coronario inicial.
- Determinación del umbral de estimulación ventricular.
- Realización de pruebas adicionales para otros estudios electrofisiológicos.
- Estimulación ventricular a frecuencias crecientes para desencadenar la fibrilación ventricular a una intensidad de estimulación triple del umbral diastólico. Se registró la entrada en fibrilación, deteniéndose en este momento la estimulación programada.
- Registro continuo de 330 s de la actividad fibrilatoria, manteniéndose en todo momento la perfusión.
- Tras este tiempo, se procedió a revertir la arritmia utilizando un desfibrilador manual aplicando choques de 2 J de energía mediante una onda bifásica.
- Estabilización durante 10 minutos de la actividad cardíaca tras revertir la fibrilación ventricular.

- Medida del flujo coronario para fijar la velocidad de infusión de la atropina.
- Infusión de atropina ($1\mu\text{M}$) durante 5 minutos con una velocidad de infusión calculada a partir del flujo coronario. La infusión se mantendría hasta la finalización del experimento.
- Medida del flujo coronario.
- Repetición del protocolo electrofisiológico.
- Medida del peso de los corazones.

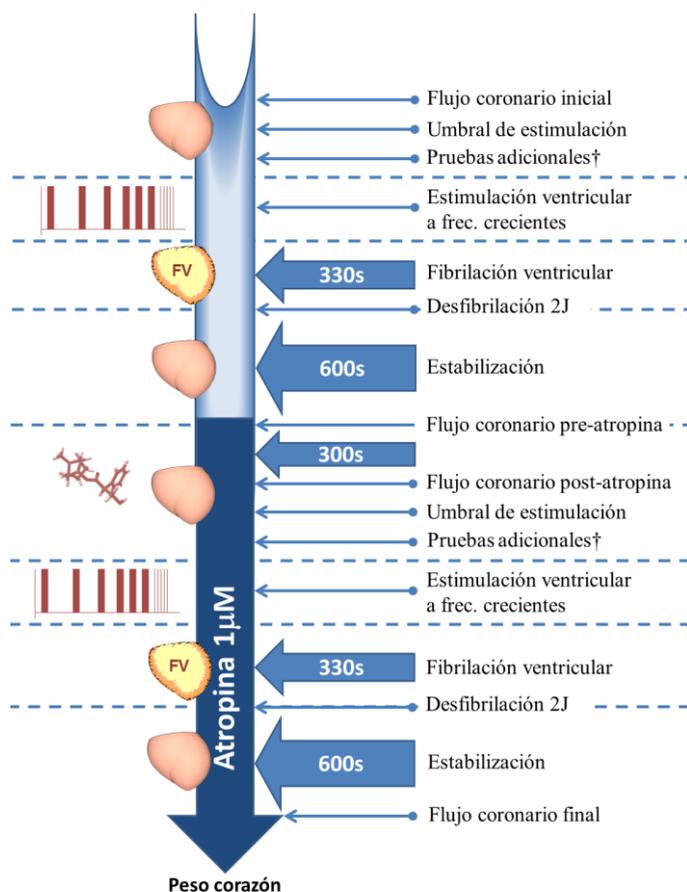


Figura 2.13 Esquema del protocolo electrofisiológico († pruebas realizadas que no son objeto de este estudio).

2.2.4 Parámetros electrofisiológicos analizados.

De los registros electrográficos se obtuvo la activación local en cada electrodo de los 240 electrodos que forman el multielectrodo identificando el momento de la pendiente máxima negativa (dV/dt) de los electrogramas ventriculares y efectuando el marcaje semiautomático de dichas pendientes durante 2 s, y más concretamente a los 5 minutos de la FV mantenida. Se estableció un umbral que debía superar la deflexión para ser considerada como una deflexión local. Dicho umbral se corresponde con el 20% del máximo valor de amplitud en cada electrograma. Cuando los electrogramas mostraban potenciales dobles o múltiples, la máxima pendiente negativa del complejo de activación fue asignada como el único tiempo de activación local. A partir de este análisis en el dominio del tiempo se obtuvieron los intervalos VV, y los histogramas medios de los intervalos VV consecutivos se determinaron en cada canal del multielectrodo durante una ventana de dos segundos a los 5 minutos de la FV mantenida en dos situaciones: pre-atropina (previa al bloqueo colinérgico) y post-atropina (tras la infusión continua de atropina), tanto en los grupos de falsos operados, controles y entrenados.

Definición de parámetros y medida de los mismos.

Todos los parámetros fueron medidos durante el transcurso de la fibrilación ventricular inducida mientras se mantuvo la perfusión coronaria con Tyrode.

Intervalos VV o intervalos de activación ventricular.

Se definen como el tiempo transcurrido entre dos activaciones locales consecutivas en el ventrículo. Como queda expresado en la figura 2.14, el programa informático determina automáticamente la distancia en ms entre dos activaciones ventriculares. Es una medida en el dominio del tiempo del trazado fibrilatorio.

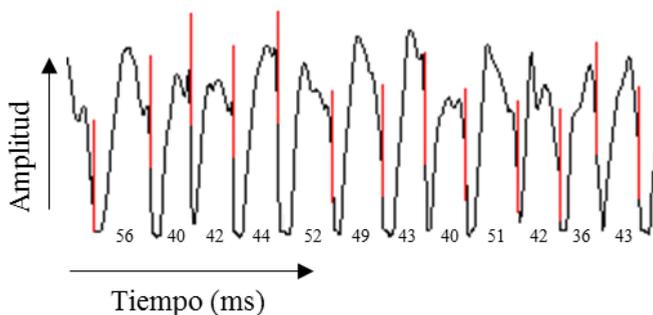


Figura 2.14 Trazado fibrilatorio marcado de forma semiautomática y con los valores de los intervalos VV correspondientes.

Periodo refractario funcional (PRF).

La refractariedad del tejido ha sido valorada a través de la medida del PRF, definiéndolo como el percentil 5 de los intervalos VV correspondiente al histograma formado por el conjunto de dichos intervalos. El percentil 5 de los intervalos VV se ha obtenido a partir de los citados histogramas mediante el programa informático PaceMap (figura 2.15).

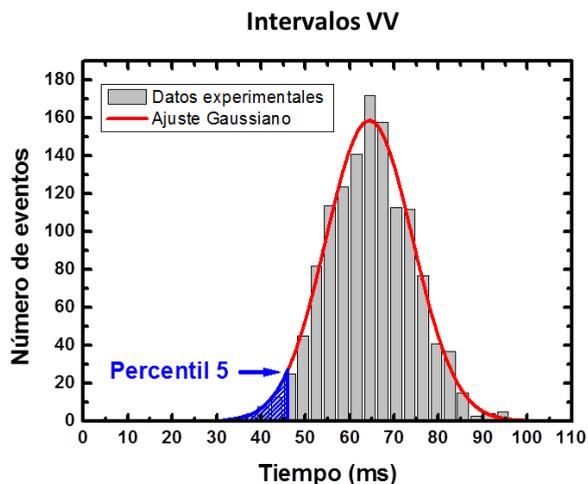


Figura 2.15 Representación de la distribución gaussiana a partir de los intervalos VV. El percentil 5 corresponde al área sombreada en azul bajo la línea del ajuste gaussiano.

Coefficiente de variación del PRF (CV)

Es un indicador de la heterogeneidad eléctrica miocárdica y se entiende como la dispersión de los valores del PRF obtenidos en cada uno de los electrodos del multielectrodo. Es determinando según la siguiente ecuación:

$$C.V. = \frac{D.E.}{promedio (PRF)} \quad (1)$$

Siendo *CV*, el coeficiente de variación del periodo refractario funcional; *DE*, la desviación estándar de dicho periodo refractario funcional y *promedio*, la media aritmética de los valores del periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular.

Tiempo de activación epicárdica.

Es el tiempo, expresado en milisegundos, que tarda en despolarizarse el tejido miocárdico. Se ha determinado en una zona concreta del ventrículo izquierdo y en una ventana de tiempo de 60ms. El tiempo de activación se determinó mediante la visualización directa del mapa de activación ventricular obtenido mediante cartografía epicárdica practicando la diferencia entre el mayor y el menor valor de forma independiente a la dirección de los diferentes frentes. Tanto antes como después de la administración de atropina, se realizaron cinco determinaciones en todos los grupos de estudio, obteniendo así un valor promedio de cinco tiempos distintos aunque próximos entre sí.

Mapas de activación epicárdica durante la FV.

Para la construcción de los mapas de activación se empleó un segmento del trazado fibrilatorio marcado semiautomáticamente. Analizándolo en 11 momentos distintos (cuya ventana temporal era de 60ms) separados entre ellos a razón de 100ms, ubicados entre el segundo 298 al 299 de la fibrilación ventricular. En cada ventana se han identificado los patrones de activación construyendo las isócronas, que se han trazado de forma semiautomática, utilizando la codificación en colores de los tiempos de activación correspondientes a cada electrodo que ofrece el programa Pacemap (figura 2.16).

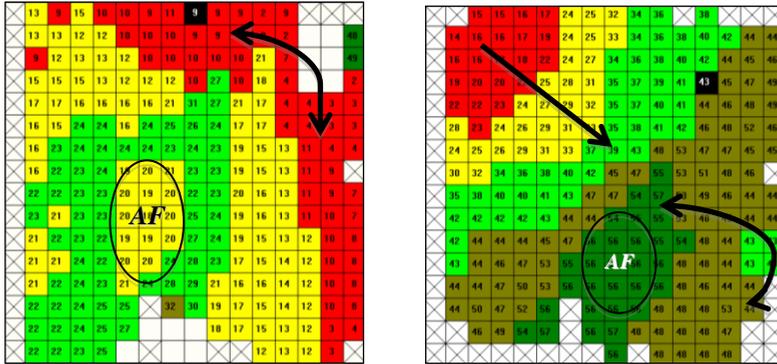
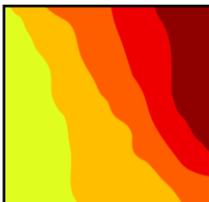


Figura 2.16 Mapas de activación epicárdicos a los que se les ha aplicado una codificación de colores para los distintos tiempos de activación, gracias al programa PaceMap. Dicha codificación de colores correspondientes a cada electrodo sigue la siguiente secuencia: rojo, amarillo, verde claro, verde oscuro, verde más oscuro, azul claro (cambios cada 10 ms). AF: afloramiento.

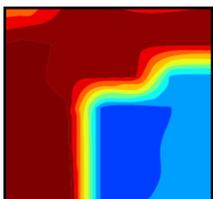
En los mapas de activación se han identificado los distintos frentes de onda estudiando la posible existencia de líneas de bloqueo de conducción, colisiones, reentradas completas y patrones de afloramiento (figura 2.16), lo que en función de su número o cuantía nos dará información acerca de la complejidad de los mapas de activación.

Complejidad de activación miocárdica ventricular.

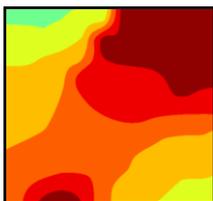
Los frentes de onda, según su comportamiento temporal y/o espacial los denominaremos como:



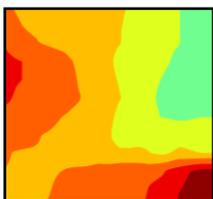
a) Frente de onda simple se da cuando existen líneas isócronas paralelas sobre el mapa siendo una transmisión superficial.



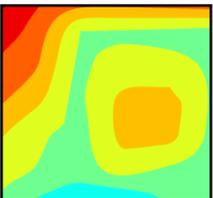
b) Zonas de bloqueo de conducción definidas como aquellas zonas en las que la velocidad de conducción estimada ha sido inferior a 5 cm/s, delimitando áreas con distinta dirección del proceso de activación.



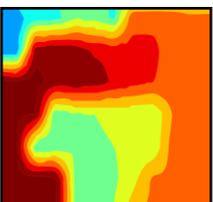
c) Colisiones se dan cuando dos o más frentes de onda se desplazan en la misma dirección pero en sentido contrario.



d) Fusión se da cuando dos o más frentes de onda se suman y se convierten en uno, siempre y cuando partan de orígenes distintos.



e) Afloramiento se identifica por la presencia de una zona de activación que forma curvas cerradas que se transmiten de endocardio a epicardio de manera centrífuga.



f) Reentrada es aquel frente de onda que tras describir una trayectoria circular o elíptica vuelve a activar la zona previamente activada por él mismo, entonces se delimita la zona central de la reentrada utilizando como referencia la parte interna del frente de onda, esto es, la zona central de la reentrada corresponde al espacio comprendido entre

los electrodos más cercanos activados en direcciones opuestas durante la trayectoria circular del frente de ondas. Se ha considerado como activación reentrante, la que produce al menos un giro completo del frente de activación, es decir, aquellos casos en los que el proceso de activación vuelve a activar la zona previamente activada por el mismo frente (reentrada completa).

Una vez identificados los distintos patrones de activación de cada una de las 11 situaciones analizadas en cada experimento, tanto antes como después de la infusión de atropina, se realizó el recuento de todos los fenómenos observados (simples, afloramientos, etc.). El sumatorio de todo ello nos ofrecía el valor de la complejidad global. Y *a posteriori* se clasificó en categorías basadas en los grados específicos de complejidad de los mismos y siguiendo un esquema basado en el descrito por Konings y cols., 1994, en el análisis de los mapas de activación durante la fibrilación auricular.

Grados específicos de complejidad.

Nuestra clasificación de los distintos grados de complejidad constó de 5 niveles o tipos que fueron agrupados según el número de activaciones y representados por números romanos; *tipo I-II*: existen como máximo dos activaciones, *tipo III*: tres activaciones, *tipo IV*: cuatro activaciones, *tipo V*: cinco activaciones y el *tipo VI*: seis o más activaciones. Obteniendo un porcentaje de los diferentes tipos de activación y de los distintos patrones de activación, siendo de especial relevancia el recuento de las reentradas y de los afloramientos.

La ventana de análisis temporal para las medidas de los parámetros electrofisiológicos, fue de dos segundos, excepto para la construcción de los mapas de activación que fue de un segundo y se llevó a cabo a los 5 minutos del inicio de la fibrilación ventricular. El análisis de los parámetros se realizó tanto antes como después de la infusión de atropina, para la comparación apareada de resultados.

2.2.5 Análisis estadístico.

Para la comparación entre los grupos entrenado y control, antes y después de la infusión de atropina, de los parámetros de periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular, su correspondiente heterogenidad, la media de los intervalos VV, los tiempos de activación epicárdica y la clasificación de la complejidad de las activaciones, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas de 2 factores sobre 1 factor. Para el estudio del efecto del entrenamiento sobre inducción de la FV, flujo y peso del corazón se empleó una prueba *t* de Student para muestras no apareadas, asimismo, se analizó el efecto del bloqueo colinérgico sobre los mismos parámetros con una prueba *t* de Student para muestras apareadas. En el caso de la determinación de la dependencia entre variables se ha realizado mediante el test Chi cuadrado para tablas de contingencia. Existen diferencias significativas cuando la $p \leq 0,05$.

Para el análisis estadístico se usó el *software* Microsoft® Excel 2007 para Windows Vista y el paquete de análisis estadístico SPSS® (versión 19), de la firma SPSS Inc.

2.2.6 Legislación.

Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales utilizados en el presente estudio fueron realizados de acuerdo con lo establecido por la Unión Europea sobre la regulación en el uso de animales con fines científicos (2003/65/CE), promulgado en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (B.O.E. 21 de octubre de 2005). El comité ético del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universitat de València aprobó todos los procedimientos utilizados.

Capítulo 3

RESULTADOS

Con excepción de parámetros como la inducción de la fibrilación ventricular y flujo coronario, el resto han sido valorados durante la fibrilación ventricular (FV) en dos situaciones diferentes: antes de la administración de atropina, que como ya hemos comentado es un bloqueante de los receptores muscarínicos y después de la administración de la misma, en dos grupos de animales: sometidos al protocolo de entrenamiento (grupo entrenado) y sedentarios (grupo control). En el grupo de falsos operados se sustituyó la atropina por Tyrode y, asimismo, se midieron los diferentes parámetros antes y después de la infusión del citado líquido nutritivo.

Este planteamiento de análisis nos permite determinar no solamente si el entrenamiento es capaz de modificar los parámetros electrofisiológicos estudiados, sino que, si ello fuese así, podríamos establecer si el sistema nervioso parasimpático intrínseco pudiese estar implicado en los correspondientes cambios.

3.1 Inducción de la FV.

Estimulamos a frecuencias crecientes mediante un sistema de estimulación programada en el ventrículo izquierdo con el fin de inducir la fibrilación ventricular. Analizamos la frecuencia de estimulación a la que se indujo la fibrilación ventricular en cada caso. Una vez realizado el marcaje de los intervalos de estimulación SS previos a la entrada en fibrilación ventricular, calculamos sus correspondientes frecuencias, tanto antes como después de la infusión de atropina y en ambos grupos de estudio. Al hacer el análisis estadístico no encontramos ningún cambio significativo. En la siguiente tabla podemos observar los resultados obtenidos en cada grupo y en ambas situaciones de estudio.

	Pre-atropina	Post-atropina
Control	13 ± 1 (7)	14 ± 3 (9)
Entrenado	13 ± 2 (8)	14 ± 2 (7)

Tabla 3.1 Frecuencia mínima de estimulación ventricular que induce la fibrilación ventricular, antes y después de la infusión de atropina, tanto en el grupo control como en el entrenado. Valores expresados en Hz como media y desviación estándar. Entre paréntesis, n° de experimentos.

3.2 Análisis de la FV en el dominio del tiempo:

3.2.1 Intervalos VV.

3.2.1.1 Efecto del entrenamiento físico.

El intervalo VV fue un 15% mayor en el grupo de corazones procedentes de animales sometidos a entrenamiento físico al compararlo con el grupo control (68 ± 10 ; n = 10 vs 78 ± 10 ms; n = 8 respectivamente). Podemos observar dicho incremento en la figura 3.1.

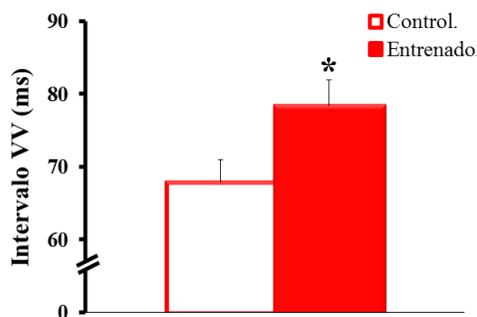


Figura 3.1 Efecto del entrenamiento físico sobre los intervalos VV en el grupo control y en el entrenado. Las barras de error corresponden al error estándar. *p<0,05.

En cuanto al efecto del entrenamiento en los intervalos VV tras la infusión de atropina, se observó una clara tendencia ($p = 0,064$) con una diferencia de un 13% al comparar el grupo control frente al entrenado (tabla 3.2). Este resultado es muy similar al evidenciado antes de la administración de atropina en la comparación de los grupos control y entrenado, aunque en este caso, con clara significación estadística. Estos resultados nos hacen pensar que el bloqueo de los receptores muscarínicos participa muy poco o nada en el alargamiento del intervalo VV observado por nosotros en los corazones procedentes de conejos sometidos a entrenamiento.

	Post-atropina
Control	67 ± 10 (9)
Entrenado	76 ± 8 (7)

Tabla 3.2 Intervalos VV después de la infusión de atropina en los grupos control entrenado, expresados en ms como media y desviación estándar. Entre paréntesis, n° de experimentos.

3.2.1.2 Efecto del bloqueo colinérgico.

Estudiamos el efecto del bloqueo colinérgico sobre la media de los intervalos VV. Una vez realizado el marcaje de los intervalos VV, antes y después de la infusión de atropina, no observamos ningún cambio, en ninguno de los dos grupos, ni en el control (68 ± 10 vs 67 ± 10 ms, respectivamente; $n = 10$) ni en el entrenado (78 ± 10 ms vs 76 ± 8 ms, $n = 8$), tal y como se puede observar en la figura 3.2.

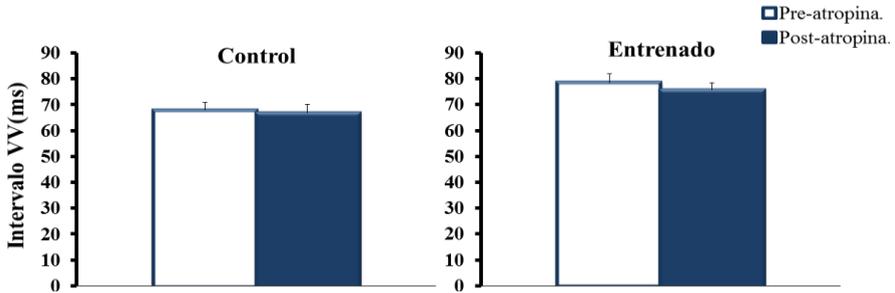


Figura 3.2 Efecto del bloqueo colinérgico sobre la longitud de los intervalos VV, en ms, en el grupo control n=10 y en el grupo entrenado n=8. Se representa el valor medio y las barras de error corresponden al error estándar.

3.2.1.3 Resultados en el grupo falso operado.

El grupo de animales denominado falso operado fue empleado para descartar la posible interferencia en nuestros resultados por el efecto que podría producir el paso del tiempo durante la aplicación de nuestro protocolo experimental, por la manipulación que conlleva y por la repetición del mismo. En la siguiente figura 3.3, los resultados obtenidos confirman que el intervalo VV permaneció inalterado en este grupo experimental, antes y después de la infusión de Tyrode y de la repetición del protocolo (67 ± 11 ; n = 10 vs 62 ± 13 ms; n = 8 respectivamente).

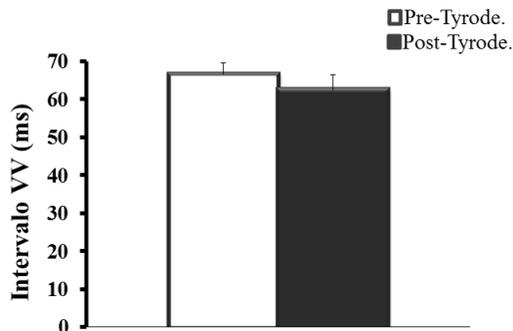


Figura 3.3 Intervalo VV en el grupo falso operado antes y después de la administración de Tyrode. Valores expresados en ms como media de 9 experimentos. Las barras de error corresponden al error estándar.

3.3 Parámetros electrofisiológicos durante la FV:

3.3.1 Periodo refractario funcional (PRF).

3.3.1.1 Efecto del entrenamiento físico.

El efecto del protocolo de entrenamiento físico aplicado modificó el periodo refractario funcional durante la FV (PRF), siendo éste mayor en el grupo entrenado tanto antes como después de la infusión de atropina. Se registró un incremento del PRF en el grupo entrenado de un 27% en relación a los controles, antes de infundir la atropina (42 ± 7 ; $n = 10$ vs 53 ± 8 ms; $n = 8$) y de un 24% en relación a los controles, tras la infusión de dicha sustancia (40 ± 6 ; $n = 10$ vs 50 ± 6 ms; $n = 8$).

Este resultado es indicativo de que el alargamiento del PRF producido por el entrenamiento no es dependiente del sistema parasimpático intrínseco.

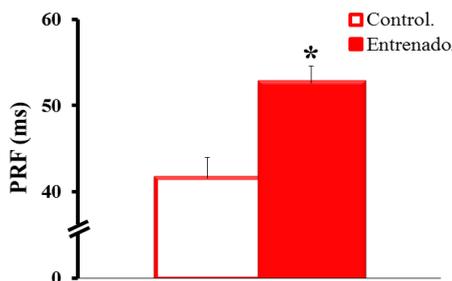


Figura 3.4 Efecto del entrenamiento físico sobre el periodo refractario funcional (PRF) durante la FV en el grupo control y en el entrenado. Las barras de error corresponden al error estándar. * $p < 0,05$.

3.3.1.2 Efecto del bloqueo colinérgico.

En la figura 3.5 podemos ver como el bloqueo colinérgico no produjo ningún efecto en lo que respecta a la modificación del periodo refractario funcional durante la fibrilación ventricular en el grupo control (42 ± 7 vs 40

± 6 ms; $n = 10$). En cuanto al grupo de animales sometidos a entrenamiento tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas (53 ± 8 ms vs 50 ± 6 ms, $n = 8$), entre antes y después de la infusión de atropina.

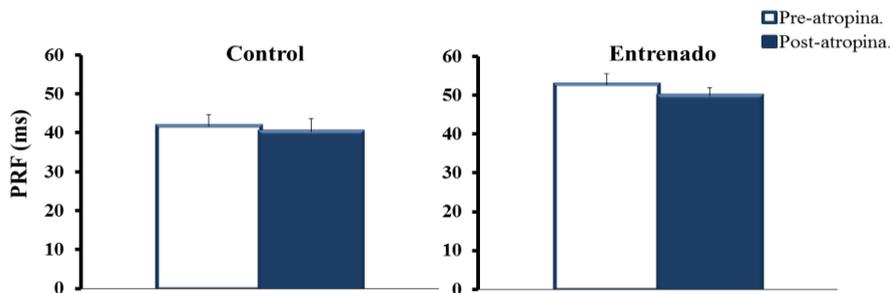


Figura 3.5 Efecto del bloqueo colinérgico sobre el periodo refractario funcional durante la FV en el grupo control y en el entrenado. Las barras de error corresponden al error estándar.

3.3.1.3 Resultados en el grupo falso operado.

En la figura 3.6 podemos observar los valores del PRF antes y después de la administración de Tyrode (45 ± 10 ; $n = 10$ vs 43 ± 12 ms; $n = 9$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dos determinaciones, lo que es indicativo de la ausencia de efectos por el tiempo o por la repetición del protocolo electrofisiológico.

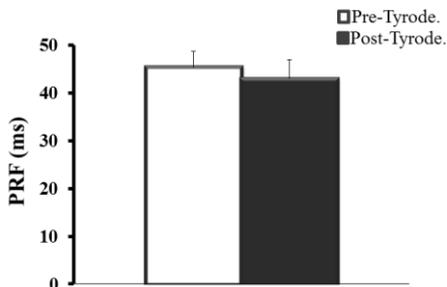


Figura 3.6 Periodo refractario funcional (PRF) durante la fibrilación ventricular en el grupo falso operado. Los resultados son la media de 9 experimentos. Las barras de error corresponden al error estándar.

3.3.2 Coeficiente de variación del PRF.

3.3.2.1 Efecto del entrenamiento físico.

El entrenamiento físico modificó el coeficiente de variación del periodo refractario funcional, produciéndose un decremento estadísticamente significativo del 17% en el grupo sometido a entrenamiento físico (figura 3.7). Ésta situación ocurre previamente a la infusión de atropina ($15,1 \pm 3,8\%$; $n = 10$ vs $12,5 \pm 1,5\%$; $n = 8$), sin embargo tras la administración del bloqueante colinérgico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,24$) entre ambos grupos ($12,2 \pm 2,4\%$; $n = 10$ vs $10,8 \pm 2,1\%$; $n = 8$).

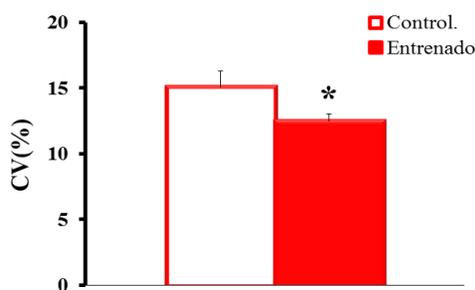


Figura 3.7 Efecto del entrenamiento físico sobre el coeficiente de variación del periodo refractario funcional durante la FV en el grupo control y en el grupo entrenado. Las barras de error corresponden al error estándar. * $p < 0,05$.

3.3.2.2 Efecto del bloqueo colinérgico.

El efecto del bloqueo colinérgico sobre la heterogeneidad del tejido miocárdico expresada como CV, en lo que respecta a la dispersión de los periodos refractarios, se modificó de forma significativa en el grupo control ($15,1 \pm 3,8\%$; vs $12,2 \pm 2,4\%$; $n = 10$); produciéndose un decremento del 19% tras la administración de atropina. Por el contrario, en el caso del grupo

de animales sometidos a entrenamiento físico no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($12,5 \pm 1,5\%$; vs $10,8 \pm 2,1\%$; $n = 8$). En la siguiente figura, expresamos los resultados en diagrama de barras.

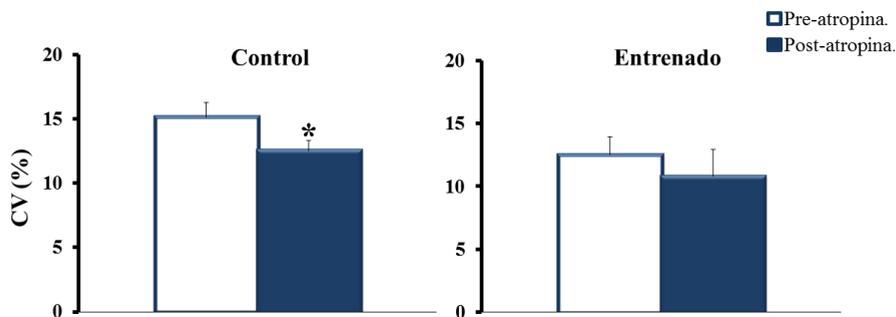


Figura 3.8 Efecto del bloqueo colinérgico sobre el coeficiente de variación del periodo refractario funcional durante la FV en el grupo control $n = 10$ y en el entrenado $n = 8$. Las barras de error corresponden al error estándar. * $p < 0,05$.

Como apreciamos en estos resultados, la disminución de la heterogeneidad miocárdica que se observa después de la administración de atropina, no se reproduce en corazones procedentes de conejos entrenados. Es posible que este hecho sea debido a que, como vamos a ver en el bloque de resultados siguiente, el entrenamiento, *per se*, disminuye la heterogeneidad.

3.3.2.3 Resultados en el grupo falso operado.

En la figura 3.9 se muestran los cambios del CV del PRF, en los dos momentos de análisis realizados durante la aplicación del protocolo experimental. Tal y como puede observarse, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas determinaciones, antes y después de la infusión de Tyrode, por lo que, como ya hemos señalado en anteriores ocasiones, no se evidencian efectos por la repetición del protocolo

experimental. Antes de la administración de Tyrode, el CV del PRF fue de $14,0 \pm 2,8\%$ y después de $13,3 \pm 2,3\%$.

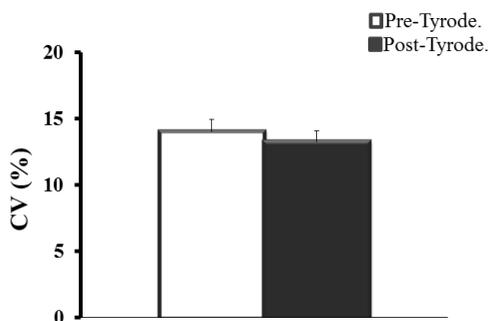


Figura 3.9 Coeficiente de variación durante la FV en el grupo falso operado (n = 9). Las barras de error corresponden al error estándar.

3.3.3 Tiempos de activación.

3.3.3.1 Efecto del entrenamiento físico.

El tiempo de activación disminuyó significativamente, sufriendo un decremento del 12% en el grupo de animales entrenados ($48,6 \pm 4,2$ vs $43,0 \pm 5,7$ ms, respectivamente) frente al grupo control antes de la administración de atropina.

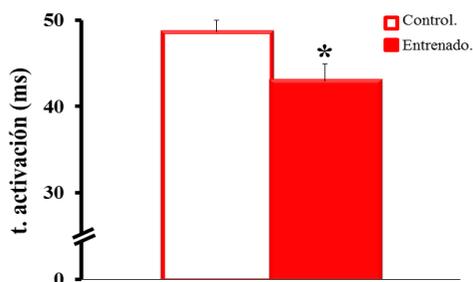


Figura 3.10 Efecto del entrenamiento físico sobre el tiempo de activación durante FV. El grupo control n = 10; grupo entrenado n = 8; las barras de error corresponden al error estándar. *p<0,05.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas tras la administración de atropina al comparar el grupo control frente al grupo entrenado ($50,3 \pm 3,7$ vs $48,5 \pm 4,4$ ms, respectivamente). Estos resultados anteriores son indicativos de que el entrenamiento produce una disminución del tiempo de activación y este efecto es abolido por la administración de atropina, implicando de alguna manera a los receptores muscarínicos en este efecto intrínseco.

3.3.3.2. Efecto del bloqueo colinérgico.

Como se puede observar en la figura 10, el efecto del bloqueo colinérgico no modificó el tiempo de activación en el grupo control ($48,6 \pm 4,2$ vs $50,3 \pm 3,7$ ms, respectivamente; $n = 10$). Sin embargo, en el grupo entrenado sí que fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas con un incremento del 13% tras la administración de atropina ($43,0 \pm 5,7$ vs $48,5 \pm 4,4$ ms, respectivamente; $n = 8$).

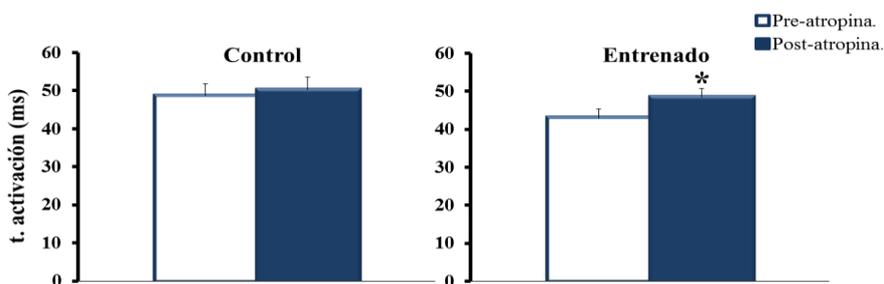


Figura 3.11 Efecto del bloqueo colinérgico sobre el tiempo de activación durante la FV en el grupo control y en el grupo entrenado. Las barras de error corresponden al error estándar. * $p < 0,05$.

3.3.3.3 Resultados en el grupo falso operado.

En la figura 3.12 se muestran los cambios del tiempo de activación ventricular. Como en ocasiones anteriores, no encontramos diferencias significativas en los dos momentos analizados. Antes de la administración de Tyrode, el CV del PRF fue de $48,8 \pm 4,8$ y después de $48,7 \pm 5,3$.

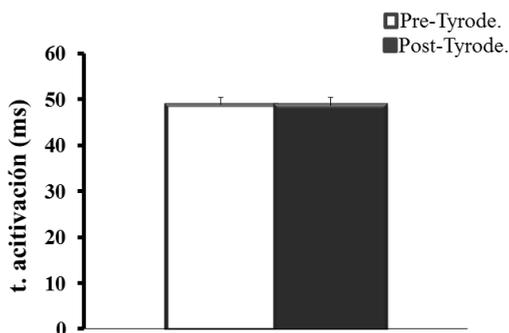


Figura 3.12 Tiempo de activación durante la fibrilación ventricular en el grupo falso operado. Grupo falso operado con una $n = 9$; ms = milisegundos. Las barras de error corresponden al error estándar.

3.4 Análisis de los mapas de activación miocárdica.

3.4.1 Complejidad global de la activación.

3.4.1.1 Efecto del entrenamiento físico.

La complejidad global fue significativamente menor en el grupo entrenado al compararlo con el grupo control, en ambas situaciones, antes ($40,7 \pm 5,2$ vs $34,6 \pm 7,5$ ms) y después de la infusión de atropina ($48,1 \pm 9,3$ vs $37,3 \pm 6,6$ ms). En la primera de ellas se produjo un decremento del 17% y en la segunda del 25%, pudiéndose observar un claro descenso en el grado

de complejidad de las señales fibrilatorias analizadas pertenecientes a los animales sometidos a un protocolo de entrenamiento físico.

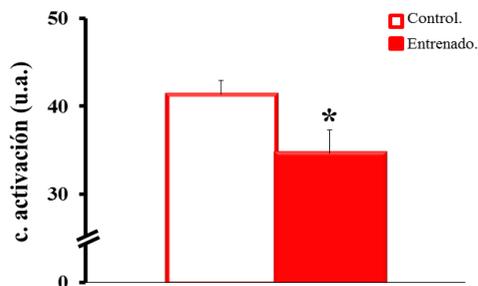


Figura 3.13 Efecto del entrenamiento físico sobre la complejidad global de la activación miocárdica durante FV. El grupo control n = 9; grupo entrenado n = 8; las barras de error corresponden al error estándar. * $p < 0,05$.

3.4.1.2 Efecto del bloqueo colinérgico.

En este apartado analizamos la participación del bloqueo colinérgico sobre un parámetro que analiza las características de la activación, dándonos información sobre el grado de la complejidad de la fibrilación ventricular en cada situación estudiada. En el caso del grupo control podemos observar, en la figura 3.14, como la infusión de atropina ejerce un efecto que puede interpretarse como negativo al incrementar el grado de complejidad de la activación miocárdica en un 17%. En cambio, en el grupo entrenado el bloqueo colinérgico no produce ningún cambio estadísticamente significativo manteniendo los valores similares a los adquiridos en la situación previa a dicha infusión.

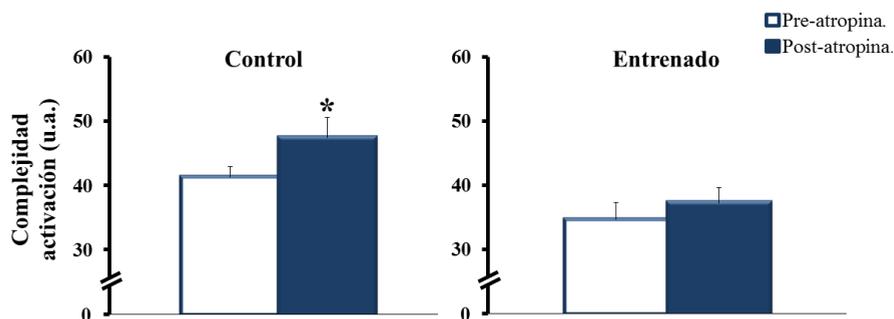


Figura 3.14 Efecto del bloqueo colinérgico sobre la complejidad global de la activación miocárdica durante la FV en el grupo control y en el grupo entrenado antes y después de la infusión de atropina, expresado como unidades arbitrarias (u.a.). Las barras de error corresponden al error estándar. * $p < 0,05$.

3.4.2 Grados específicos de complejidad de activación.

Como ya hemos mencionado en el apartado de métodos, los distintos grados de complejidad fueron agrupados en 5 tipos, representados por números romanos y clasificados según el número de activaciones: *tipo I-II*: existen como máximo dos activaciones, *tipo III*: tres activaciones, *tipo IV*: cuatro activaciones, *tipo V*: cinco activaciones y el *tipo VI*: seis o más activaciones.

3.4.2.1 Efecto del entrenamiento físico.

El entrenamiento físico modificó los niveles de complejidad más simples y los más complejos, incrementando de forma significativa los de baja complejidad, es decir, los denominados *tipo I-II* y reduciendo los de alta complejidad, el *tipo V* de forma estadísticamente significativa y el *tipo VI* con una clara tendencia ($p=0,06$); todo ello en la situación previa al bloqueo colinérgico. En cuanto al análisis de la FV inducida tras la infusión de atropina, tuvo un comportamiento similar a la situación previa, dando lugar a

un aumento estadísticamente significativo del *tipo III* y a una disminución tanto del *tipo V* como del *tipo VI* en el grupo entrenado (tabla 3.3).

		Tipos de Complejidad				
		<i>I-II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>
Pre-atropina	Control	14 (14%)	26 (26%)	35 (35%)	17 (17%)	7 (7%)
	Entrenado	28 (32%)	30 (34%)	21 (24%)	7 (8%)	2 (2%)
Post-atropina	Control	9 (9%)	17 (17%)	31 (31%)	26 (26%)	16 (16%)
	Entrenado	17 (19%)	33 (38%)	27 (31%)	8 (9%)	3 (3%)

Tabla 3.3 Número de mapas de activación en FV (valores absolutos y relativos) clasificados en función a su complejidad y porcentaje de patrones observados (*tipo I-II, tipo III, tipo IV, tipo V y tipo VI*), en el grupo control (n=9) y entrenado (n=10), antes y después de la infusión de atropina.

Los resultados de la tipificación de la complejidad de la activación de los mapas en FV se muestran en la figura 3.15, previamente presentados en la tabla 3.3. Se agruparon los datos en tablas de contingencia, y se observó que el entrenamiento reducía la complejidad expresada en porcentajes de tipos de mapas de activación. En la figura 3.16, se representan los mapas de activación, con su complejidad correspondiente, de un experimento de cada uno de los grupos estudiados.

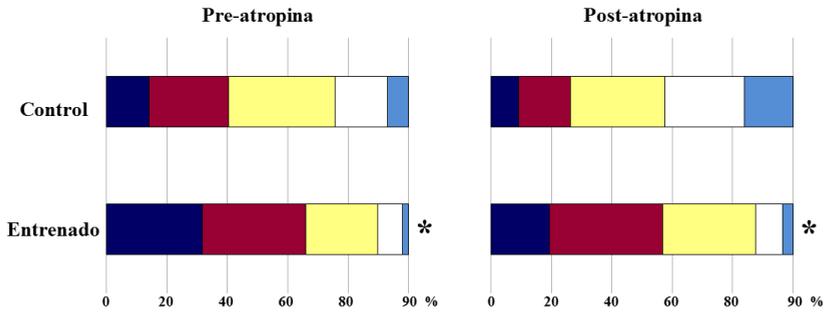


Figura 3.15 Resultados de la tipificación de la complejidad de la activación de los mapas en FV, en ambos grupos y en ambas situaciones. Los números corresponden a los porcentajes de los patrones observados clasificados atendiendo a su complejidad (*tipo I-II, tipo III, tipo IV, tipo V y tipo VI*), previamente a la infusión de atropina y después de la misma, tanto en el grupo control (n=9) como el grupo entrenado (n=8). *p<0,05.

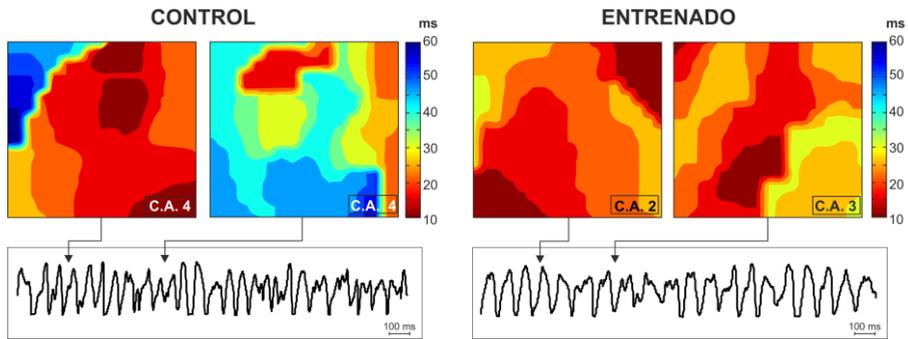


Figura 3.16 Representación de mapas de activación y electrogramas en un experimento del grupo control y en experimento del grupo entrenado (C.A.: complejidad de activación; ms: milisegundos).

En la tabla 3.4 se muestran, en valor relativo, los diferentes tipos de activaciones con sus correspondientes porcentajes según la cantidad de patrones de activación observados en cada grupo experimental. Los datos fueron agrupados en tablas de contingencia, al realizar una prueba Chi-cuadrado. No encontramos relación entre los tipos de patrones al comparar entre los grupos control y entrenado, por lo que podemos decir que el entrenamiento físico no modificó los patrones de activación en cuanto a porcentaje se refiere.

	Frentes	Afloramientos	Reentradas
Control	245(69 %)	102(29 %)	8(2 %)
Entrenado	204(75 %)	63(23 %)	6(2 %)

Tabla 3.4 Número y porcentaje de patrones observados (frentes de onda simples, reentradas y afloramientos) en los mapas de activación en FV, en el grupo control ($n=10$) y en el grupo entrenado ($n=8$).

3.4.2.2 Efecto del bloqueo colinérgico.

En cuanto a los resultados de las estadísticas realizadas para comparar cada tipo por separado, podríamos destacar que en el grupo control existe un incremento estadísticamente significativo del número de situaciones agrupadas en la complejidad de tipo VI, el grupo de mayor complejidad, como consecuencia del bloqueo colinérgico inducido por la infusión de atropina (figura 3.17, control). Este resultado va en la misma línea que el incremento de la complejidad global citada en el apartado anterior. En lo que respecta al grupo entrenado no observamos ningún cambio estadísticamente significativo al analizar los distintos grados de complejidad (figura 3.17, entrenado)

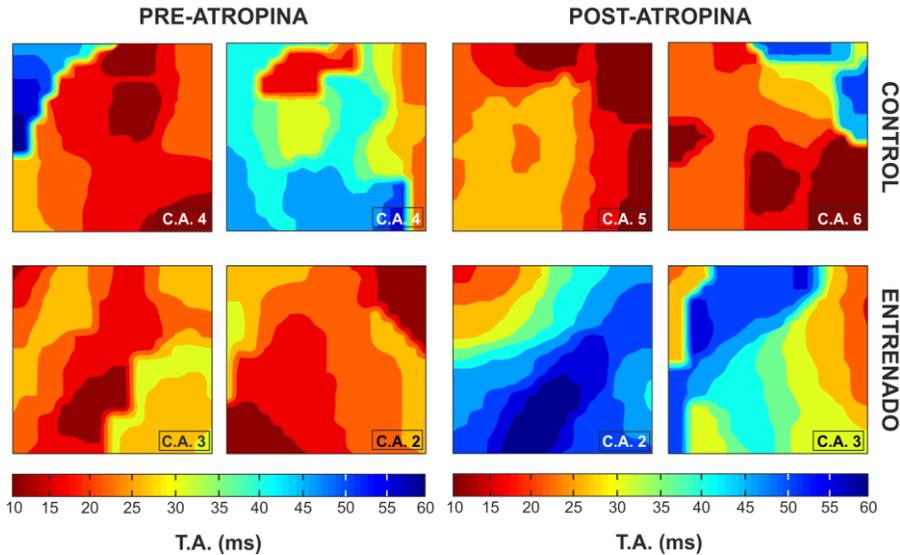


Figura 3.17 Mapas de activación antes y después de la infusión de atropina, en un experimento del grupo control y en un experimento del grupo entrenado. En la parte superior de la figura se muestran 4 ejemplos correspondientes al grupo control, 2 de ellos antes de la infusión de atropina: el primero presenta complejidad 4 (*tipo IV*; 3 frentes y 1 afloramiento) y el segundo complejidad 4 (*tipo IV*; 2 frentes y 2 afloramiento); y 2 de ellos tras la infusión de atropina: el primero presenta complejidad 5 (*tipo V*; 4 frentes y 1 afloramiento) y el segundo muestra complejidad 6 (*tipo VI*; 5 frentes y 1 afloramiento). En la parte inferior de la figura se muestran, del mismo modo que en la superior, 4 ejemplos correspondientes al grupo control, 2 de ellos antes de la infusión de atropina: el primero presenta complejidad 3 (*tipo III*; 2 frentes y 1 afloramiento) y el segundo muestra complejidad 2 (*tipo II*; 2 frentes); y 2 de ellos tras la infusión de atropina: el primero de ellos presenta complejidad 2 (*tipo II*; 2 frentes) y el segundo muestra complejidad 3 (*tipo III*; 3 frentes) (C.A.: complejidad de activación; T.A.: tiempo de activación; ms: milisegundos).

En la tabla 3.5 se muestran, en valor relativo, los diferentes tipos de activaciones con sus correspondientes porcentajes según la cantidad de patrones de activación observados en cada grupo experimental y en cada situación estudiada, antes y después de la infusión de atropina. Los datos fueron agrupados en tablas de contingencia, al realizar una prueba Chi-cuadrado. No encontramos relación entre los tipos de patrones al comparar

en cada grupo en las dos situaciones de estudio, es decir, antes y después de la infusión del bloqueante de los receptores colinérgicos intrínsecos del corazón.

		Frentes	Afloramientos	Reentradas
Pre-atropina	Control	245(69 %)	102(29 %)	8(2 %)
	Entrenado	204(75 %)	63(23 %)	6(2 %)
Post-atropina	Control	294 (63 %)	162 (35 %)	7 (2 %)
	Entrenado	204 (71 %)	77 (27 %)	6 (2 %)

Tabla 3.5 Porcentaje de patrones observados (frentes de onda simples, reentradas y afloramientos) en los mapas de activación en FV, antes y después de la infusión de atropina, tanto en el grupo control ($n=10$) como en el entrenado ($n=8$).

3.5 Flujo coronario.

Se realizaron cuatro medidas del flujo coronario a lo largo del experimento; al inicio del mismo, antes de infundir atropina, tras el inicio de la infusión de atropina y al final del experimento. En la siguiente tabla puede observarse dichos valores normalizados por el peso del corazón (ml/min/g). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de este valor entre los diferentes grupos. Asimismo el flujo coronario fue estable a lo largo del experimento en todos los grupos.

	Inicio	Pre-atropina	Post-atropina	Fin
Control	3,47±0,9	3,10±0,9	2,99±0,9	2,79±0,9
Entrenado	3,36±0,9	3,05±1,1	2,92±0,9	2,79±1,1
Falso operado	3,42±0,9	3,05±0,8	2,92±0,8	2,71±0,6

Tabla 3.6 Flujo coronario de los corazones normalizado por su propio peso. Expresados como las medias \pm desviación estándar; el número de experimentos son los siguientes: el grupo control $n=9$, el grupo entrenado $n=8$ y en el caso del grupo falso operado $n=6$.

3.6 Peso de los corazones.

En lo que respecta al peso de los corazones, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Los valores promedios obtenidos con sus correspondientes desviaciones estándar de la masa cardíaca en cada grupo fueron: control $14,23 \pm 2,7g$ ($n=11$), entrenado $14,41 \pm 2,1g$ ($n=11$) y falso operado $15,36 \pm 2,7g$ ($n=10$).

Capítulo 4

DISCUSIÓN

4.1 Consideraciones generales.

En la presente tesis doctoral hemos estudiado la posible participación del sistema nervioso parasimpático intrínseco cardiaco, sin influencias humorales o del sistema nervioso central, sobre algunas de las modificaciones electrofisiológicas que el entrenamiento físico produce en el corazón. Además de la refractariedad, en parte investigada ya por nuestro grupo, hemos estudiado otros parámetros que hasta el momento se desconocen, como la facilidad para inducir la fibrilación ventricular y los obtenidos a partir del análisis de la citada arritmia, como son los intervalos VV, la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio, el tiempo de activación y la complejidad del patrón fibrilatorio.

En relación con los conocimientos existentes sobre la refractariedad miocárdica, debemos comentar que existen antecedentes (Zarzoso y cols., 2012) acerca de los efectos del ejercicio físico y del bloqueo colinérgico sobre la refractariedad miocárdica intrínseca, pero no hemos encontrado estudios sobre las características de esta propiedad durante la fibrilación ventricular y sobre los efectos que podría tener el ejercicio físico y el sistema parasimpático intrínseco en esta situación fisiopatológica sobre ella.

En lo que respecta al tipo de investigación cabe decir que el presente, es un trabajo predominantemente básico, aunque no por ello menos importante. Nosotros hemos investigado posibles mecanismos que puedan explicar adaptaciones que el ejercicio físico produce en el corazón, órgano vital para el ser humano. Más aún, nos hemos centrado en la fibrilación ventricular que es la arritmia más letal; por lo que los conocimientos generados sobre este tema podrían tener gran relevancia clínica.

Para investigar los mecanismos por los que el ejercicio físico produce las modificaciones electrofisiológicas cardiacas sin influencias del control central, hemos empleado un modelo de corazón aislado del animal y por tanto carente de inervación extrínseca, lo que nos permite descartar las influencias centrales nerviosas o humorales. Evidentemente, nos hemos cerciorado (Nylander y cols., 1982; Such y cols., 2002; 2008) de que nuestro modelo experimental produce, en respuesta al ejercicio, modificaciones eléctricas miocárdicas, para así poder estudiar la participación de posibles mecanismos intrínsecos como las neuronas parasimpáticas postganglionares y su papel en la aparición de los citados efectos.

4.2 Consideraciones sobre la metodología empleada.

Si bien es cierto que los resultados procedentes de modelos animales no se asemejan totalmente a la clínica humana, y en consecuencia cualquier intento de extrapolación de resultados debe hacerse con cautela, ellos son necesarios porque permiten realizar estudios controlados y aplicar métodos de exploración que no se deben realizar, por razones legales y éticas, en los seres humanos. No obstante, las consideraciones éticas en el uso de modelos animales siguen siendo importantes, y hay una continua búsqueda de otros modelos para explorar, en este caso, las arritmias ventriculares (Hamlin, 2007). En el presente estudio se ha pretendido aplicar en la medida de nuestras posibilidades la regla de las “3R” de la experimentación animal-reemplazo, reducción y refinamiento-, intentando minimizar el efecto indeseable de producir daño a los animales de experimentación.

La regla de las “3R” fue propuesta en el año 1959 por William Russell y Rex Burch. La primera regla pretende reemplazar los métodos que emplean animales por cualquier método científico que emplee “materiales insensibles”. Existen distintos tipos de reemplazos, en nuestro estudio hemos empleado el directo, empleando tejidos *in vitro* en lugar de *in vivo*, aunque es un avance, no se trata de un reemplazo total del animal. En cuanto a la segunda regla, la reducción, trata de disminuir el número de animales necesarios para obtener información con precisión de un acontecimiento dado. Nosotros, en la aplicación de esta regla, no calculamos estadísticamente en su momento el número muestral necesario. No obstante, decidimos el tamaño muestral sobre la base de trabajos previos con similar metodología. En cualquier caso, ya estamos aplicando el análisis estadístico del cálculo muestral (programa informático “G-Power”) para estudios experimentales con errores alfa y beta, así como la potencia, similares al presente, y el número muestral que obtenemos es prácticamente el mismo que hemos utilizado en esta tesis doctoral. Por lo tanto, estamos muy seguros de haber empleado el menor número de animales necesarios para llegar a conclusiones lo más precisas posibles. La tercera y última regla, se centra en el refinamiento que trata de introducir cualquier desarrollo que haga disminuir la severidad de los procedimientos que se les aplica a los animales. Esta regla se ha ido ampliando para incluir todos los aspectos de la vida del animal de laboratorio, es decir, abarcando desde el nacimiento hasta la muerte. Este estudio experimental ha sido refinado con el fin de minimizar el sufrimiento o la angustia del animal. Todo ello se plantea con el fin de defender el bienestar de los animales en los laboratorios, motivado tanto por los propios animales como por la fiabilidad de los resultados experimentales,

y con ello, de los productos científicos y técnicos de que se beneficiarán los humanos.

4.2.1. Respecto al modelo animal.

Con el fin de cumplir con nuestros objetivos creemos haber elegido el modelo animal en el que:

- ✓ Se producen las adaptaciones cardiovasculares características producidas por la realización de ejercicio físico crónico.
- ✓ La fibrilación ventricular es fácilmente inducible y lo suficientemente estable para asegurar su mantenimiento durante el tiempo de aplicación del protocolo.
- ✓ Las neuronas colinérgicas intracardiacas están presentes.

Tradicionalmente, las preparaciones con tórax abierto de perro y cerdo fueron consideradas los mejores modelos experimentales para extrapolación de la fibrilación ventricular a humanos, dada la similitud del tamaño del corazón de estos animales al de nuestra especie (Panfilov, 2006). No obstante, algunos nuevos modelos animales han sido introducidos para los estudios de fibrilación ventricular, incluyendo la perfusión de corazón en pequeños animales en sistema Langendorff.

Nuestro modelo animal es el conejo, y es considerado por muchos autores (DiCarlo y Bishop, 1990; Such y cols., 2002; 2008) idóneo para estudios sobre los efectos del entrenamiento físico, entre otras razones porque el conejo de laboratorio es, a semejanza de los humanos en general, sedentario, y con protocolos de ejercicio adaptados con una apropiada intensidad, duración y frecuencia, podemos obtener muy fácilmente una respuesta

cardiovascular característica del entrenamiento físico (DiCarlo y Bishop, 1990).

Efectivamente, estos autores valoraron la influencia de los aferentes cardíacos en la regulación arterial barorrefleja de la actividad nerviosa simpática renal, lo que fue examinado antes y después de un programa de entrenamiento de resistencia. El programa de entrenamiento de resistencia de 8 semanas dio lugar a una bradicardia inducida por el ejercicio (disminución de la frecuencia cardíaca tanto en reposo como durante una prueba de esfuerzo). En reposo, los conejos sometidos a entrenamiento ofrecieron valores de frecuencia cardíaca en promedio de 210 latidos minuto en contraste con los 242 que presentaban los conejos no entrenados. Durante la carrera en cinta rodante a una velocidad de 15,0 m/min, con una pendiente del 20%, la frecuencia de los conejos entrenados subió a 287 latidos minuto, mucho menos que la que alcanzaron los conejos no sometidos a entrenamiento (390 latidos minuto).

En esta misma línea, Billman (2002) propone al conejo como el modelo animal óptimo para estudios similares al desarrollado por nosotros, ya que es más fácil de inducir y mantener la FV debido al tamaño de su corazón y por el ritmo cardíaco en reposo, que es más lento que animales más pequeños, como la rata o el ratón.

Otros autores como el ya citado Panfilov (2006), considera que los corazones de pequeños animales, a pesar de que difieran en tamaño en relación al humano más de un orden de magnitud, la fibrilación ventricular puede ser inducida. Para este autor, a la hora de extrapolar resultados acerca de la fibrilación ventricular, más importante que la diferencia real del tamaño cardíaco entre especies, es que exista similitud en lo que él denomina

tamaño efectivo cardiaco. Este concepto tiene en consideración, aparte del tamaño en sí de la víscera cardiaca, la longitud de onda de reentrada, que determina la fibrilación ventricular. El tamaño efectivo cardiaco resultaría del cociente de la raíz cúbica del peso de corazón y del período de rotación de la onda espiral de reentrada. Se ha demostrado que los patrones de onda en el corazón de conejo durante arritmias ventriculares, determinado por el tamaño efectivo del corazón y la longitud de onda de la reentrada, son muy similares a la del humano.

Por otro lado, también se ha demostrado que los aspectos críticos de excitación-contracción de acoplamiento en el miocardio de conejo, como la contribución relativa del retículo sarcoplásmico, es muy similar al acoplamiento excitación-contracción del ser humano. (Maier y cols., 2000).

Además de que las características electrofisiológicas del corazón de conejo puedan ser muy similares a las del corazón humano (Panfilov, 2006; Gao y cols., 2007; Gaustad y cols., 2010), y abundando acerca de la idoneidad del corazón de conejo para estudios de esta naturaleza, aparte de lo ya comentado, entendemos que también desde el punto de vista morfológico, existe una importante similitud con el corazón humano en lo que se refiere al sistema nervioso vegetativo intrínseco. A este respecto, Saburkina y cols. (2014) estudiaron la topografía de los plexos nerviosos intrínsecos situados en la superficie del corazón de conejo y en el tabique interauricular mediante un marcaje histoquímico mediante la acetilcolinesterasa usando corazones enteros presión-distendido y preparaciones de montaje-entero en conejos californianos, llegando a la conclusión que a pesar de las diferencias anatómicas en la distribución de las neuronas cardiacas intrínsecas y la presencia de plexos nerviosos bien desarrollados en el hilio del corazón, la topografía de los siete subplexos de

los plexos nerviosos intrínsecos en corazón de conejo corresponde bastante bien a otras especies de mamíferos, incluyendo a los seres humanos.

4.2.2. Respecto a la preparación experimental.

Uno de los valores de importancia de la preparación de Langendorff es que es útil para determinar, bajo condiciones controladas, propiedades del corazón (por ejemplo, cronotropismo, dromotropismo, refractariedad, inotropismo, lusitropismo y la resistencia vascular coronaria) sin influencias nerviosas autonómicas, farmacológicas (producidas por la anestesia, por ejemplo), o de metabolitos. Asimismo, este tipo de preparación permite acceder directamente a diversas zonas de estudio.

Las preparaciones experimentales basadas en el uso de sistemas de tipo Langendorff, son fáciles de realizar y proporcionan un alto rendimiento ya que no necesariamente requieren grandes cantidades de líquido de perfusión, ni tampoco necesariamente soluciones coloidosmóticas. Además, el corazón recibe todos sus componentes básicos, que se perfunden a través de su propia circulación coronaria y capilar, manteniendo una situación bastante cercana a la fisiológica “in vivo”.

Por otra parte, nuestra preparación tipo Langendorff, sin carga, nos evita los cambios que se producirían cuando se utiliza una preparación de *working heart*. Las preparaciones que no someten al corazón a una postcarga no producen, obviamente efectos como consecuencia del trabajo cardiaco. Por tanto, así nos aseguramos de que las modificaciones que se observen en el grupo entrenado, se deben al propio protocolo de entrenamiento físico. Quizá el único inconveniente que pudiese tener nuestra preparación en cuanto a la carga se refiere, es que el ventrículo derecho sí posee una

pequeña precarga (unos 50 ml. por minuto de flujo coronario) como consecuencia del retorno del Tyrode a dicho ventrículo a través de la aurícula derecha, tras perfundir las coronarias. Este efecto creemos que ha sido minimizado en nuestro estudio, al haber obtenido los registros electrofisiológicos en una zona concreta del ventrículo izquierdo.

4.2.3. Respecto al fármaco de elección.

La sustancia utilizada para realizar el bloqueo farmacológico del sistema nervioso parasimpático ha sido la atropina (como sal de sulfato), un alcaloide natural que actúa como antagonista competitivo del receptor muscarínico, con una concentración de 1 μ M. Estos alcaloides no poseen selectividad alguna por ningún tipo de receptor muscarínico. El principal efecto conocido de la atropina sobre el corazón consiste en modificar la frecuencia cardiaca. Aunque la respuesta predominante es la taquicardia, la frecuencia cardiaca suele disminuir de forma transitoria con las dosis promedio que se emplean en la clínica (0,4 a 0,6 mg). Este efecto inesperado se ha atribuido al bloqueo de los receptores muscarínicos M_1 presinápticos presentes en las terminaciones nerviosas posganglionares parasimpáticas en el nodo sinoauricular que normalmente inhiben la liberación de acetilcolina. Las dosis más elevadas de atropina (alrededor de 0,2 mg) producen taquicardia progresiva al bloquear los receptores M_2 en las células del marcapaso del nodo SA, antagonizando de esta manera el tono parasimpático (vagal) del corazón. La eliminación del tono vagal cardiaco por la atropina también puede facilitar la conducción AV. La atropina acorta el periodo refractario funcional del nodo AV y puede incrementar la respuesta ventricular en pacientes que tienen fibrilación auricular (Goodman y Gilman, 2012). En nuestro estudio buscamos averiguar el posible efecto que pueda

producir el citado antagonismo pero en una situación en donde el corazón está denervado y cuya procedencia no es humana sino de animales de experimentación. Entre las concentraciones que se plantearon varían de 0,1 a 10 μM según la literatura, habiendo sido demostrado que con una concentración de 0,5 μM es suficiente para realizar un bloqueo total y efectivo de los receptores muscarínicos en el corazón de conejo (Habermeier-Muth y Muscholl, 1988; Accili y Di Francesco, 1996). Nosotros hemos escogido una concentración de 1 μM (equivaldría a $2,32 \times 10^{-6}$ /gramo de corazón) con el fin de mantener un margen de seguridad en el bloqueo de receptores muscarínicos ante hipotéticas variaciones del flujo coronario, y, a la vez, no utilizar una concentración demasiado elevada de la sustancia que pudiese resultar tener otros efectos no vinculados al bloqueo colinérgico.

4.2.4. Respecto al protocolo de entrenamiento físico.

Muchos de los trabajos experimentales que se han realizado sobre ejercicio físico, han tomado como modelo de estudio la rata. Los trabajos sobre entrenamiento físico llevado a cabo en conejos son más escasos y existe una gran diversidad en cuanto a los métodos de entrenamiento utilizados, pudiendo encontrarse tanto protocolos continuos (Chen y Li, 1993; Carroll, 2003; Becker y cols., 2004; de Moraes y cols., 2008) como discontinuos (Meng y Pierce, 1990; Such y cols., 2002; 2008) con un rango de intensidades variable entre estudios. También existen discrepancias en cuanto a la predisposición de los conejos Nueva Zelanda para la carrera, de forma que algunos autores han encontrado dificultades para hacer correr a los animales durante más de 1-2 minutos a una modesta velocidad de $13 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ (Faris y cols. 1982).

Por las razones que a continuación exponemos, consideramos que nuestro modelo de entrenamiento físico en conejos, es adecuado, en tanto que no solamente es capaz de generar cambios electrofisiológicos cardiacos, sino también, bioquímicos. Esta efectividad del protocolo de entrenamiento utilizado en el presente estudio ya ha sido discutida en trabajos anteriores (Zarzoso, 2011; Such y cols., 2008; Pelechano, 2008). Los principales hallazgos al respecto, según describe Pelechano (2008), citada por Zarzoso (2011), son los siguientes:

- El protocolo de entrenamiento físico produce un descenso de la frecuencia cardiaca en reposo, tanto *in vivo* como *in vitro*, en el grupo de animales entrenados (Such y cols., 2008; Pelechano, 2008). La modificación de este parámetro se ha considerado tradicionalmente como uno de los sellos característicos del entrenamiento aeróbico (Blomqvist y Saltin, 1983).
- En cuanto a la concentración de lactato, analizado en diversas fases del protocolo de entrenamiento, también se aprecian cambios sugestivos de respuesta a la ejecución de ejercicio físico crónico. Los datos de Pelechano fueron coincidentes con lo expuesto por Astrand (1992) y García Manso y cols. (1996), quienes mostraron que, con el entrenamiento aeróbico, tras el inicio de la actividad se produce una respuesta inicial en la que aumenta la concentración de lactato y, transcurrido un tiempo, éste retorna a valores similares al reposo.
- Asimismo, con un protocolo idéntico de entrenamiento físico aplicado a otras series de conejos, se obtuvieron aumentos en las expresiones de la enzima óxido nítrico sintasa inducible de un 51% y en la proteína de

choque térmico HSP60 de un 35% en el grupo de animales entrenado en relación con los controles (Such y cols., 2008). Gómez-Cabrera y cols. (2005) relacionaron el aumento en la expresión de proteínas como las anteriormente mencionadas con las adaptaciones producidas por el entrenamiento físico utilizando dos protocolos de diferentes intensidades. Asimismo, un estudio realizado por Husain y Hazelrigg (2002) mostró también un incremento en la expresión de la enzima iNOS y del óxido nítrico en el miocardio de ratas sometidas a entrenamiento físico.

Por tanto, a la vista de los anteriores resultados, puede decirse que el protocolo de entrenamiento utilizado en este estudio produce modificaciones en una serie de marcadores de entrenamiento, tanto específicos como inespecíficos del entrenamiento físico de tipo aeróbico, por lo que consideramos que se trata de un protocolo adecuado para la realización del estudio.

4.3 Consideraciones sobre los resultados obtenidos.

Como hemos comentado al principio de este capítulo, hemos estudiado los efectos del ejercicio físico crónico sobre la vulnerabilidad miocárdica, refractariedad del miocardio ventricular, la dispersión del período refractario funcional ventricular (como un índice de heterogeneidad electrofisiológica del miocardio), los tiempos de activación, la frecuencia de activación durante la fibrilación ventricular analizando esta arritmia en el dominio del tiempo (intervalo VV), la complejidad de la activación durante la fibrilación ventricular, y el papel de las neuronas colinérgicas del miocardio en estos parámetros en corazón aislado de conejo.

El entrenamiento físico ha producido, en el presente estudio, una serie de cambios electrofisiológicos en el miocardio ventricular como son el incremento de la longitud de los intervalos VV, el incremento de la refractariedad, la disminución de la heterogeneidad del tejido, la disminución de los tiempos de activación y la disminución de la complejidad del proceso de activación miocárdica. Por otro lado, la participación de las neuronas parasimpáticas intrínsecas miocárdicas en estos cambios debidos al entrenamiento solamente la hemos observado en el caso de los tiempos de activación.

4.3.1 Inducibilidad de la FV.

En cuanto a la facilidad de inducción de la fibrilación, tal y como hemos comentado en el capítulo de resultados, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos grupos ni en ninguna de las dos situaciones, antes y después de la administración de atropina. Se trata de un parámetro que nos da información acerca de la vulnerabilidad

miocárdica para la inducción de la arritmia y al igual que en otras investigaciones, en donde estudian las adaptaciones que se producen en el corazón tras aplicar un protocolo de entrenamiento (Arad y cols., 1990), tampoco se dieron diferencias al comparar el umbral fibrilatorio en corazones sometidos a un protocolo de entrenamiento frente a los corazones controles. Sin embargo, otros estudios como el de Dor-Haim y cols. (2013) relacionan el ejercicio físico con una reducción de la propensión a la fibrilación asociada a una remodelación cardíaca intrínseca relacionada con un rango espectral más amplio y componentes de frecuencia más rápidos en el ECG. Este estudio difiere del nuestro tanto en el modo de inducción de la FV, como en el modelo animal empleado, la zona de registro miocárdica y el protocolo de entrenamiento empleado.

Estudios clásicos, como el de Han y Moe (1964), relacionan el periodo refractario y la heterogeneidad del mismo con la mayor o menor facilidad en la inducibilidad de la fibrilación ventricular. Si bien es cierto que en nuestro modelo experimental sí hemos encontrado cambios en la heterogeneidad y en el período refractario debidos al entrenamiento, no los hemos encontrado en cuanto a vulnerabilidad ventricular se refiere. Efectivamente al realizar un análisis de correlación (datos no mostrados), no encontramos ninguna significación.

4.3.2 Intervalos VV.

Como ya hemos comentado en el capítulo de resultados, se dio un incremento de los intervalos VV durante la FV tras la aplicación del protocolo de entrenamiento físico, dicho cambio no se vio alterado tras la

acción de atropina, por lo que el sistema nervioso parasimpático intrínseco no está participando en estas modificaciones.

Anteriores investigaciones siguen la misma línea en lo que se refiere al mayor intervalo VV en el grupo entrenado al compararlo con el grupo control, los cambios inducidos por el entrenamiento en el automatismo, conducción y refractariedad miocárdica no están mediados por la actividad de las neuronas parasimpáticas posganglionares (Zarzoso y cols., 2012). En un modelo experimental similar al del presente estudio, se examinó la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular y se encontró que este parámetro fue menor en el grupo entrenado que en el grupo de control. Tanto la frecuencia más baja de la fibrilación ventricular como el mayor intervalo VV obtenido en los animales entrenados, refuerza la idea de que el ejercicio físico crónico aumenta la refractariedad ventricular intrínseca, que como es bien conocido, está estrechamente relacionado con estos últimos parámetros, como ha sido publicado previamente (Chorro y cols., 2000). De forma similar a los resultados obtenidos por Zarzoso y cols. (2012), en los que el bloqueo de los receptores colinérgicos no cambió la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular, no hemos encontrado ninguna modificación del intervalo VV después del bloqueo colinérgico.

4.3.3 Refractariedad.

Los resultados de esta investigación muestran que el ejercicio físico crónico aumenta la refractariedad ventricular del miocardio y que el bloqueo colinérgico no modifica esta propiedad en ninguno de los dos grupos de estudio, animales entrenados y no entrenados.

El aumento de la refractariedad debido al ejercicio físico crónico que hemos observado ha sido publicado previamente (Such y cols., 2002; 2008; Zarzoso y cols., 2012) usando una metodología diferente para determinar esta propiedad, como ya se ha indicado con anterioridad. Esta metodología consiste en aplicar una serie de trenes cada uno de ellos compuesto por diez estímulos seguidos de un extraestímulo que se va acercando al último estímulo del tren a razón de cinco milisegundos. Nosotros hemos empleado la fibrilación ventricular como herramienta metodológica en nuestro estudio, para valorar la refractariedad ventricular desde otra vertiente, porque, como se ha comentado, la determinación del período refractario ventricular funcional construido a partir de múltiples ciclos consecutivos de fibrilación ventricular de electrogramas unipolares del ventrículo izquierdo, presenta varias ventajas (Duytschaever y cols., 2001), es decir, que permite una estimación del período refractario en más de doscientos puntos diferentes del miocardio, y no solamente en el lugar de aplicación del electrodo de estimulación como ocurre cuando se utiliza el test del extraestímulo. Duytschaever y cols. comparan diferentes métodos para determinar el período refractario durante la fibrilación auricular utilizando como referencia el método denominado “mapping” ya que lo considera el método “gold standard”. La búsqueda de metodologías alternativas se debe a que el citado método solamente se puede aplicar en circunstancias excepcionales y es por ello que lo emplean como referencia para poder utilizar otra metodología que se aproxime a los valores obtenidos con el método de referencia pero que sea más sencilla de realizar. Entre las metodologías comparadas en el trabajo de Duytschaever y cols., se encuentra la empleada en esta tesis, el percentil 5 de la longitud del ciclo durante la fibrilación ventricular (LCFV), cuya correlación con la metodología de referencia es de 0’90, siendo la segunda

correlación que se aproxima más a la de referencia y además no requiere de ningún tipo de estimulación evitando de este modo que pueda interferir en las condiciones experimentales y por consiguiente en los resultados.

El bloqueo colinérgico no modifica la refractariedad, como hemos comentado valorada mediante el percentil 5 de la LCFV, ni en animales entrenados ni en animales no entrenados, lo que sugiere que las neuronas colinérgicas no parecen tener ningún efecto directo sobre esta propiedad en condiciones de sedentarismo y en condiciones de entrenamiento.

Es bien sabido que la refractariedad miocárdica es una propiedad, junto con la velocidad de conducción, que determina la longitud de onda del proceso de activación del miocardio, que a su vez es un factor estrechamente relacionado con la aparición y la estabilidad de arritmias por reentrada a lo largo del tiempo (Wijffels y cols., 1995). Este autor estudió la progresión de la fibrilación auricular mantenida y la relacionó con los cambios electrofisiológicos que se producen en el miocardio auricular como consecuencia del mantenimiento de dicha arritmia. En el citado estudio se relaciona el mantenimiento de la fibrilación auricular con un acortamiento del periodo refractario auricular, de la mediana de los intervalos de la fibrilación y con la disminución de la longitud de onda, que favorecen la formación de circuitos reentrantes intra-auriculares. Sobre la base de las afirmaciones de Wijffels y cols., los resultados obtenidos en el presente estudio, en el sentido de un aumento tanto de la refractariedad ventricular, como de los intervalos VV descritos en el apartado anterior, podemos interpretarlos como un mecanismo de protección contra las arritmias reentrantes. Dicho de otro modo: la realización de ejercicio físico podría operar beneficiosamente por este mecanismo, entre otros.

4.3.4 Heterogeneidad eléctrica miocárdica.

Los resultados muestran que la heterogeneidad, valorada a través del análisis de la dispersión del periodo refractario funcional ventricular, es mayor en el grupo control que en el grupo entrenado antes de la administración de atropina y hay una clara tendencia ($p = 0,06$), a la repetición de este resultado, después de la administración de atropina. El bloqueo colinérgico redujo la heterogeneidad miocárdica en el grupo control, pero no en el entrenado, por lo que a la vista de los resultados, el entrenamiento físico evita las modificaciones producidas por el bloqueo de los receptores muscarínicos presentes en el miocardio.

La disminución de la dispersión de la refractariedad producida por el entrenamiento físico observado en el presente estudio, como ya hemos comentado en lo que respecta a la refractariedad, indica que el protocolo de entrenamiento ha ejercido un efecto antiarrítmico al disminuir la heterogeneidad electrofisiológica miocárdica. De hecho, es clásicamente conocida la importancia de la heterogeneidad y del periodo refractario en la inducción de la fibrilación en el corazón como fue demostrado en el estudio de Han y Moe en 1964. Por lo tanto, los cambios en la refractariedad y la heterogeneidad podrían participar como un mecanismo básico adicional en el que el ejercicio aeróbico tiene un efecto protector contra las arritmias reentrantes, tales como la fibrilación ventricular que puede producir la muerte cardíaca súbita (Billman, 2002). En lo que respecta a la disminución de la dispersión de la refractariedad en el miocardio ventricular después de bloqueo colinérgico, aunque no hemos investigado los mecanismos para explicar este efecto en la heterogeneidad ventricular en este estudio, debemos tener en cuenta las siguientes consideraciones: los datos

acumulados en los últimos quince años dan cuenta de la complejidad de las neuronas intracardíacas en la modulación de la función del corazón. Se sabe que las neuronas cardíacas intrínsecas generan actividad espontánea (Arora y cols., 2001) y que pueden funcionar de manera independiente de las señales de entrada generadas por las neuronales centrales (para revisión ver Armour, 2008). Más aún, estudios recientes muestran que en ausencia de la actividad vagal la acetilcolina es liberada por las neuronas colinérgicas en los mamíferos (Abramochkin y cols., 2010). Estos conocimientos nos permiten especular que de manera similar a los efectos ejercidos por la acetilcolina en las aurículas, acortando el período refractario auricular y aumentando la dispersión de los mismos (Liu y Nattel, 1997), es decir, la heterogeneidad eléctrica, si ocurriese una liberación de acetilcolina en el ventrículo de corazón aislado, y por lo tanto no sometido al control del sistema nervioso central, también podría aumentar la dispersión de los periodos refractarios ventriculares. Esto podría explicar la disminución de la heterogeneidad ventricular en términos de la dispersión del período refractario funcional durante la FV después del bloqueo colinérgico.

4.3.5 Complejidad de la activación eléctrica miocárdica.

Los resultados obtenidos en lo que a la complejidad de la activación miocárdica durante la fibrilación ventricular se refiere, han mostrado un menor valor del índice utilizado en el grupo entrenado al compararlo con el grupo control, y este valor se incrementó después del bloqueo colinérgico en el grupo control, pero no en los animales entrenados.

En lo que respecta a la disminución en la complejidad de la activación durante la fibrilación ventricular producida por el ejercicio físico, debería ser

interpretado como un efecto beneficioso, ya que este decremento en la complejidad de la activación implica un aumento en la estabilidad eléctrica del miocardio y por lo tanto un efecto protector frente a la producción de arritmias por reentrada (Han y Moe, 1964). En este estudio no hemos investigado los mecanismos por los que el bloqueo colinérgico produce un incremento en la complejidad de la activación miocárdica durante la FV en el grupo control.

Aunque parezca paradójico que el bloqueo colinérgico haya disminuido la heterogeneidad electrofisiológica (apartado 4.3.4) en el grupo control, a pesar de un aumento en la complejidad de la activación, no es el único caso en donde la complejidad progresa en una línea distinta a la esperada. De hecho, en un estudio realizado por Chorro y cols. (2000a) donde se investigan diferentes propiedades, como la refractariedad y la complejidad de los mapas de activación eléctrica, empleando distintos fármacos, como la flecainida, el sotalol y el verapamil, también obtuvieron resultados aparentemente paradójicos. Los resultados acerca de la refractariedad, velocidad de conducción y otros parámetros electrofisiológicos, fueron significativamente diferentes según el fármaco utilizado, sin embargo mantuvieron todos los grupos (diferentes fármacos) un bajo nivel de complejidad de la activación ventricular. En otra investigación realizada por el mismo grupo (Chorro y cols., 2000b) estudian la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular y la complejidad de la activación miocárdica cuando se administra un fármaco, verapamil, y cuando se produce un estiramiento agudo miocárdico. De los resultados que obtuvieron de la citada investigación pudieron concluir que aunque tanto el estiramiento miocárdico como el verapamil aceleraron la fibrilación ventricular, valorado a través de

la frecuencia dominante, cada una de las situaciones mencionadas (verapamil o estiramiento) obró efectos opuestos sobre la complejidad del patrón fibrilatorio. Si tenemos en consideración que según estudios de Zaitsev (2000) existe una correlación directamente proporcional entre la frecuencia dominante y su coeficiente de variación de la misma durante la fibrilación ventricular (índice de heterogeneidad) podemos concluir que cabría la posibilidad de que heterogeneidad y complejidad vayan en el mismo sentido, como se puede observar en los resultados de nuestro estudio.

También en relación con la complejidad de la activación y la heterogeneidad eléctrica miocárdica, hay que remarcar que, a diferencia del grupo control, el grupo entrenado no presenta modificaciones de estos parámetros durante el bloqueo colinérgico. Este resultado nos hace suponer que el entrenamiento físico pudiese modificar algunas propiedades miocárdicas ventriculares que se expresasen en el sentido de convertir al miocardio ventricular en menos susceptible a la acción directa de neuronas colinérgicas intrínsecas. Más aún, podemos decir sobre la base de los resultados obtenidos que la influencia de las citadas neuronas en dichos parámetros sería bastante irrelevante, ejerciendo solamente algún efecto indirecto mediante la acción vagal, aunque esto no ha sido planteado en nuestro estudio.

4.3.6 Tiempo de activación.

Tal como se ha comentado en el apartado anterior el entrenamiento ha provocado una disminución del índice de complejidad de la activación miocárdica durante la FV. Este efecto se ha observado tanto antes como después de la perfusión de atropina. La disminución de la complejidad ha coincidido con una disminución de los afloramientos y un aumento de los

frentes de activación identificados en el epicardio (distintos de los afloramientos). La disminución del índice de complejidad ha sido concordante con el aumento de los mapas de activación más simples y la disminución de los de alta complejidad. Los efectos del entrenamiento y de la atropina han sido contrapuestos (la atropina en el grupo control ha dado lugar a un aumento del índice de complejidad y de los afloramientos, una disminución de los frentes epicárdicos (distintos de los afloramientos) y un incremento de los mapas de alta complejidad). De tal modo que la atropina aunque no ha impedido los cambios inducidos por el entrenamiento sí que ha ejercido cierta modulación de los mismos. Estos efectos contrapuestos también se han reflejado en los tiempos de activación determinados al analizar los mapas epicárdicos durante la FV. El tiempo de activación ha disminuido en el grupo de animales entrenados y esta disminución ha coincidido con la reducción de los afloramientos, el aumento de los frentes epicárdicos, el aumento de los mapas de activación más simples y la reducción de los mapas con mayor complejidad. Estos resultados son coherentes ya que un menor grado de complejidad de la activación implica una activación más rápida en la zona analizada. Por otra parte el análisis de estos resultados también parece indicar que el aumento de los afloramientos introduce mayor complejidad y mayores tiempos de activación tal como ocurre al perfundir la atropina en el grupo control. Este hecho sugiere que las activaciones procedentes del endocardio o de las capas medias de las paredes ventriculares influyen en el grado de complejidad y que este tipo de actividad es modulada tanto por el entrenamiento como por la atropina, aunque sus efectos también son contrapuestos, dejando abierta la posibilidad de que las neuronas colinérgicas intrínsecas estén modificando la activación procedente de estas zonas miocárdicas.

4.4 Consideraciones finales respecto a los resultados.

A la vista de los resultados deberíamos tener en cuenta una serie de consideraciones. Sabemos, gracias a investigaciones realizadas por Armour y cols. (1998), que las neuronas colinérgicas intracardiacas pueden operar con un cierto grado de independencia de las entradas neuronales extrínsecas, y que la actividad espontánea de los ganglios puede darse aunque estén descentralizados de manera aguda (Armour y Hopkins, 1990). Esta actividad de los ganglios de forma independiente al control central podría explicar, en cierto modo, que las neuronas colinérgicas intracardiacas ejercieran un cierto control colinérgico sobre propiedades miocárdicas como la heterogeneidad electrofisiológica, así como sobre la complejidad de la activación eléctrica, a pesar de que estas neuronas no parecen influir en las modificaciones producidas en los parámetros anteriormente citados por el ejercicio físico crónico. Es especialmente remarcable que, a diferencia del grupo control, en el grupo entrenado no hayamos observado modificaciones ni en la heterogeneidad ni en la complejidad de la activación eléctrica como consecuencia del bloqueo colinérgico, lo que nos lleva a suponer que el entrenamiento disminuye la susceptibilidad del miocardio ventricular a las influencias directas de las neuronas colinérgicas intrínsecas en ciertos parámetros electrofisiológicos.

Los resultados obtenidos, no los atribuimos a variaciones en el flujo coronario o a variaciones en la masa miocárdica de los animales, ya que estos no fueron diferentes entre ambos grupos, control o entrenado. La administración de atropina no modificó el flujo coronario, ni en controles ni en animales entrenados. Por otro lado, la repetición del protocolo experimental tampoco ha sido responsable de las modificaciones observadas

en diferentes parámetros, dado que los animales falsos operados tuvieron resultados similares antes y después de la administración de Tyrode.

En resumen, podemos decir que la aplicación de nuestro protocolo de entrenamiento físico a un grupo de conejos ha producido, en el corazón aislado y perfundido, una serie de modificaciones electrofisiológicas como son el incremento de la refractariedad ventricular junto con el de los intervalos VV durante la FV, la disminución de la heterogeneidad electrofisiológica ventricular, del tiempo de activación epicárdica total, y la reducción de la complejidad de la activación eléctrica durante la fibrilación ventricular. El bloqueo colinérgico producido con la administración de atropina durante la aplicación del protocolo experimental no ha producido modificaciones en los parámetros investigados en el grupo de animales entrenados, y por tanto el sistema nervioso parasimpático intrínseco cardiaco no parece que tenga efecto directo sobre las propiedades investigadas. A excepción de la medida del tiempo de activación que al igual que otros parámetros, como la heterogeneidad electrofisiológica ventricular y la complejidad de la activación eléctrica, analizados en corazones procedentes de animales no sometidos a ningún tipo de protocolo de entrenamiento, el bloqueo colinérgico sí que parece estar participando en las modificaciones de las propiedades en corazón aislado. Con todo ello, tanto por los cambios que el entrenamiento físico como los que el bloqueo colinérgico produce sobre las propiedades miocárdicas estudiadas sería necesario plantear un posterior estudio para poder dilucidar los mecanismos básicos implicados en las citadas modificaciones y los mecanismos por los que las neuronas colinérgicas modifican directamente algunos parámetros.

4.5 Limitaciones del estudio.

En cuanto a la metodología, la falta de definición del protocolo de entrenamiento utilizado es una limitación a considerar. Como ya se ha discutido, la eficacia del protocolo de entrenamiento físico no es cuestionable, se trata de un protocolo que produce una serie de adaptaciones características del entrenamiento de resistencia aeróbico. No obstante, podría definirse con una mayor precisión si la intensidad del mismo se refiriese al VO_{2max} . A este respecto, es destacable y a la vez sorprendente la falta de estudios relacionados con los métodos de entrenamiento en este modelo animal, lo que deja una vía abierta para futuras investigaciones. El poder estudiar el impacto de diferentes protocolos de entrenamiento sobre las características, ya no sólo electrofisiológicas, sino también sobre las modificaciones morfológicas, celulares y bioquímicas que se producen en el corazón podría ofrecer una valiosa información sobre el proceso de adaptación al ejercicio físico y los mecanismos por los cuales puede ejercer su efecto protector frente a la aparición de arritmias letales, o conocer las razones por las cuales podría proporcionar un sustrato determinante para la aparición de las mismas como ha sido demostrado por estudios recientes (Benito y cols., 2011). De este modo, con una definición más precisa de los protocolos de entrenamiento podría determinarse qué tipo de ejercicio es más beneficioso para la salud, hasta el punto de que el entrenamiento de resistencia aeróbica es considerado para algunos autores como "una maniobra antiarrítmica no farmacológica" (Billman, 2002) y a partir de qué punto el ejercicio físico puede ser perjudicial.

La utilización de registros epicárdicos durante los procesos de activación recopilados en un entorno tridimensional limita la interpretación de los patrones de activación, particularmente en los patrones de activación centrífuga que son los que asumimos que corresponden a los afloramientos epicárdicos de frentes de onda que aparecen desde regiones intramiocárdicas o subendocárdicas.

En cuanto al electrodo múltiple de registro utilizado para obtener los registros epicárdicos ha sido suficiente para el análisis de los parámetros estudiados en la presente tesis doctoral, aunque para el estudio de la complejidad de la fibrilación ventricular nos podría haber ayudado la utilización de un electrodo múltiple capaz de registrar la actividad intramural y endocárdica, y de este modo darnos información complementaria y poder esclarecer con más certeza lo que está ocurriendo en la superficie del miocardio. En cuanto al tamaño del electrodo, hay que tener en cuenta que, al no abarcar todo el miocardio ventricular, pueden quedar fuera del análisis fenómenos que ocurren en zonas no investigadas durante el estudio.

Finalmente, en el modelo animal empleado, al mantenerse la perfusión coronaria durante la fibrilación, no existe isquemia ni deterioro metabólico propio del desarrollo de la arritmia en corazón *in situ* (como lo demuestra una amplia bibliografía en la que se emplea este modelo experimental). Aunque, esta limitación facilita el análisis de otros fenómenos relacionados con la fibrilación ventricular, y de los efectos de diferentes fármacos.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos estudiado las modificaciones electrofisiológicas que el ejercicio físico regular produce sobre los intervalos VV, la refractariedad, la heterogeneidad electrofisiológica, la complejidad de la activación miocárdica y la posible participación del sistema nervioso parasimpático intrínseco en dichas modificaciones. Todo ello analizado durante la fibrilación ventricular empleando un modelo de corazón aislado de conejo. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, podemos realizar las siguientes conclusiones:

1.- Se confirma que la realización de ejercicio físico crónico produce un incremento de la refractariedad ventricular, valorada durante la fibrilación ventricular, y que este incremento no es dependiente de la actividad de las neuronas postganglionares parasimpáticas.

2.- Los intervalos entre los complejos de activación ventriculares sucesivos durante la fibrilación ventricular se alargan por la realización de ejercicio físico, y este cambio, tampoco es dependiente de la actividad neuronal parasimpática intrínseca.

3.- La ejecución del protocolo de ejercicio físico crónico genera efectos electrofisiológicos miocárdicos, sobre la base de la disminución de la heterogeneidad que produce durante la fibrilación ventricular. Estos efectos beneficiosos son reproducidos por el bloqueo de la actividad colinérgica.

4.- La realización de ejercicio físico crónico reduce la complejidad eléctrica miocárdica global a expensas fundamentalmente de la sustitución de patrones de activación de alto índice de complejidad por patrones de bajo índice de complejidad, no pudiéndose vincular este efecto a modificaciones de la actividad colinérgica intrínseca.

5.- La administración de atropina en corazones procedentes de animales sedentarios, modifica la heterogeneidad y la complejidad global de la fibrilación ventricular.

6.- Los tiempos de activación ventriculares durante la fibrilación ventricular son menores después de la realización de un protocolo de ejercicio físico crónico, siendo este efecto abolido tras el bloqueo colinérgico.

7.- El ejercicio físico crónico no ha resultado beneficioso en lo que se refiere a la modificación de la vulnerabilidad miocárdica de inducción de la FV.

8.- Los cambios electrofisiológicos producidos por el ejercicio físico crónico durante la fibrilación ventricular, no son dependientes de variaciones en la masa miocárdica o flujo coronario.

Capítulo 6

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

Abildskov, J. A. (1994). Additions to the wavelet hypothesis of cardiac fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 5(6), 553-559.

Abramochkin, D.V., Kuz'min, V.S., Sukhova, G.S., & Rozenshtaukh, L.V. (2010). Investigation of pacemaker shift in the rabbit sinoatrial node using the optical mapping technique. *Biofizika*, 55(3), 500-6.

Allessie, M. A., Kirchhof, C. J., & Konings, K. T. (1996). Unraveling the electrical mysteries of atrial fibrillation. *European Heart Journal*, 17 Suppl C, 2-9.

Anholm, J. D., Foster, C., Carpenter, J., Pollock, M. L., Hellman, C. K., & Schmidt, D. H. (1982). Effect of habitual exercise on left ventricular response to exercise. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, 52(6), 1648-1651.

Arad, M., Schwalb, H., Mahler, Y., Appelbaum, Y.J., & Uretzky, G. (1990). The effect of swimming exercise on spontaneous ventricular defibrillation and ventricular fibrillation threshold in the isolated perfused rat heart. *Cardioscience*, 1(4), 295-9.

Armour, J. A. (1973). Physiological behavior of thoracic cardiovascular receptors. *The American Journal of Physiology*, 225(1), 177-185.

Armour, J. A. (1986). Neuronal activity recorded extracellularly in chronically decentralized in situ canine middle cervical ganglia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 64(7), 1038-1046.

Armour, J. A. (1991). Anatomy and function of the intrathoracic neurons regulating the mammalian heart. In *Reflex Control of the Circulation*, ed. Zucker IH & Gilmore JP, pp. 1-37.

Armour, J. A. (2004). Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(2), R262-71.

Armour, J. A. (2008). Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. *Experimental Physiology*, 93(2), 165-76.

Armour, J. A. (2010). Functional anatomy of intrathoracic neurons innervating the atria and ventricles. *Heart Rhythm: the official of the Heart Rhythm Society*, 7(7), 994–996.

Armour, J. A., & Hopkins, D. A. (1990a). Activity of canine in situ left atrial ganglion neurons. *The American Journal of Physiology*, 259(4 Pt 2), H1207-15.

Armour, J. A., & Hopkins, D. A. (1990b). Activity of in vivo canine ventricular neurons. *The American Journal of Physiology*, 258(2 Pt 2), H326-36.

Armour, J. A., Collier, K., Kember, G., & Ardell, J.L. (1998). Selectividad diferencial de las neuronas cardiacas en los ganglios autonómicos intratorácica separada. *American Journal Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274, R939 - r949.

Armour, J. A., Murphy, D. A., Yuan, B. X., Macdonald, S., & Hopkins, D. A. (1997). Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *The Anatomical Record*, 247(2), 289–298.

Armour, J.A. (1976). Instant-to-instant reflex cardiac regulation. *Cardiology*, 61, 309-328.

Armour, J.A. (1999). Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system. *Cardiovascular Research*, 41(1), 41-54.

Arora, R. C., Hirsch, G. M., Johnson Hirsch, K., Hancock Friesen, C., & Armour, J.A. (2001). Function of human intrinsic cardiac neurons in situ. *American Journal of Physiology*, 280, R1736- 40.

Astrand, P. O. (1992). Physical activity and fitness. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(6 Suppl), 1231S-1236S.

Bar-Shlomo, B. Z., Druck, M. N., Morch, J. E., Jablonsky, G., Hilton, J. D., Feiglin, D. H., et al. (1982). Left ventricular function in trained and untrained healthy subjects. *Circulation*, 65(3), 484-488.

Billman, G. E. (2002). Aerobic exercise conditioning: A nonpharmacological antiarrhythmic intervention. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 92(2), 446-454.

Billman, G. E. (2009). Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: Effect of endurance exercise training. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 297(4), H1171-93.

Billman, G.E. (2006). A comprehensive review and analysis of 25 years of data from an in vivo canine model of sudden cardiac death: Implications for future anti-arrhythmic drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(3), 808–35.

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

Blomqvist, C. G., & Saltin, B. (1983). Cardiovascular adaptations to physical training. *Annual Review of Physiology*, 45, 169-189.

Bonaduce, D., Petretta, M., Cavallaro, V., Apicella, C., Ianniciello, A., Romano, M., Marciano, F. (1998). Intensive training and cardiac autonomic control in high level athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30(5), 691-696.

Boraita Perez, A., & Serratos Fernandez, L. (1998). "The athlete's heart": Most common electrocardiographic findings]. ["El corazon del deportista": hallazgos electrocardiograficos mas frecuentes] *Revista Espanola de Cardiologia*, 51(5), 356-368.

Brack, K. E., Coote, J. H., & Ng G. A. (2004). Interaction between direct sympathetic and vagus nerve stimulation on heart rate in the isolated rabbit heart. *Experimental Physiology*, 89(1), 128–139.

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

Brown, A.M. (1967). Excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibers during myocardial ischemia. *The Journal of Physiology*, 190(1), 35–53.

Burashnikov, A., & Antzelevitch, C. (2003). Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. *Circulation*, 107(18), 2355–2360.

Cardinal, R., Pagé, P., Vermeulen, M., Ardell, J.L., & Armour, J.A. (2009) Spatially divergent cardiac responses to nicotinic stimulation of ganglionated plexus neurons in the canine heart. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 145, 55–62.

Carlisle, E. J., Allen, J. D., Kernohan, W. G., Anderson, J., & Adgey, A. A. (1990). Fourier analysis of ventricular fibrillation of varied aetiology. *European Heart Journal*, 11(2), 173-181.

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

Caulfield, M.P. (1993). Muscarinic receptors-characterization, coupling and function, *Pharmacology & Therapeutics*, 58(3), 319–379.

Cha, Y. M., Birgersdotter-Green, U., Wolf, P. L., Peters, B. B., & Chen, P. S. (1994). The mechanism of termination of reentrant activity in ventricular fibrillation. *Circulation Research*, 74(3), 495-506.

Chattipakorn, N., Shinlapawittayatorn, K., & Chattipakorn, S. (2005). Electrophysiological Mechanisms of Ventricular Fibrillation Induction. *Indian Pacing Electrophysiological Journal*, 5(1), 43–50.

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

Chicharro J. L. (2006). *Fisiología del ejercicio*. Editorial Médica Panamericana.

Chorro, F. J., Canoves, J., Guerrero, J., Mainar, L., Sanchis, J., Such, L., & Lopez-Merino, V. (2000). Alteration of ventricular fibrillation by flecainide, verapamil, and sotalol: An experimental study. *Circulation modifications in the dominant frequency of ventricular fibrillation under conditions of*, 101(13), 1606-1615.

Chorro, F. J., Guerrero, J., Canoves, J., Martinez-Sober, M., Mainar, L., Sanchis, J., & Lopez-Merino, V. (1998). Quantification of the ischemia and reperfusion: An experimental study. *Pacing and Clinical Electrophysiology, PACE*, 21(9), 1716-1723.

de Moraes, R., Valente, R. H., Leon, I. R., Trugilho, M. R., Nobrega, A. C., Perales, J., & Tibirica, E. (2008). Chronic dynamic exercise increases apolipoprotein A-I expression in rabbit renal cortex as determined by proteomic technology. *British Journal of Sports Medicine*, 42(5), 386-388.

Díaz, B. (2012). Efecto del ejercicio físico crónico sobre las características de la fibrilación ventricular, la refractariedad y el proceso de activación miocárdica durante la arritmia, en el corazón normalmente oxigenado y tras isquemia regional aguda. Tesis doctoral. Universitat de València.

DiCarlo, S. E., & Bishop, V. S. (1990). Exercise training enhances cardiac afferent inhibition of baroreflex function. *The American Journal of Physiology*, 258(1 Pt 2), H212-20.

Dor-Haim, H., Berenfeld, O., Horowitz, M., Lotan, C., & Swissa, M. (2013). Reduced Ventricular Arrhythmogeneity and Increased Electrical Complexity in Normal Exercised Rats. *PLoS One*, 8(6), e66658.

Duncker, D.J. & Bache, R.J. (2008). Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiological Reviews*, 88(3), 1009-1086.

Duytschaever, M., Mast, F., Killian, M., Blaauw, Y., Wijffels, M., & Allessie, M. (2001). Methods for determining the refractory period and excitable gap during persistent atrial fibrillation in the goat. *Circulation*, 104(8), 957-62.

Efimov, I. R., Sidorov, V., Cheng, Y., & Wollenzier, B. (1999). Evidence of three-dimensional scroll waves with ribbon-shaped filament as a mechanism of ventricular tachycardia in the isolated rabbit heart. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 10(11), 1452-1462.

Fareh, S., Villemaire, C., & Nattel, S. (1998). Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation*, 98(20), 2202-2209.

Farges, J. P., Ollagnier, M., & Faucon, G. (1977). Influence of acetylcholine, isoproterenol, quinidine and ouabain on effective refractory periods of atrial and ventricular myocardium in the dog. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*, 227(2), 206-219.

Faris, I. B., Jamieson, G. G., & Ludbrook, J. (1982). Effect of exercise on gain of the carotid-sinus reflex in rabbits. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 63(2), 115-119.

Fletcher, G. F., Balady, G. J., Amsterdam, E. A., Chaitman, B., Eckel, R., Fleg, J., et al. (2001). Exercise standards for testing and training: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, 104(14), 1694-1740.

Ganong W.F. (2004). *Fisiología médica*. Méjico: El Manual Moderno.

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

Gatti, P. J., Johnson, T. A., Phan, P., Jordan, I. K., 3rd, Coleman, W., & Massari, V. J. (1995). The physiological and anatomical demonstration of functionally selective parasympathetic ganglia located in discrete fat pads on the feline myocardium. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 51(3), 255-259.

Gaustad, S. E., Rolim, N., & Wisloff, U. (2010). A valid and reproducible protocol for testing maximal oxygen uptake in rabbits. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation: Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, 17(1), 83-88.

Girasole, A.E., Palmer, C.P., Corrado, S.L., Marie, S.E., Ardell, J.L., & Hardwick, J.C. (2011). Angiotensin II potentiates adrenergic and muscarinic modulation of guinea pig intracardiac neurons. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301, R1391–R1399.

Gomez-Cabrera, M. C., Borrás, C., Pallardo, F. V., Sastre, J., Ji, L. L., & Vina, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *The Journal of Physiology*, 567(Pt 1), 113-120.

Goodman & Gilman (2012). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (12ª ed.). McGraw-Hill Interamericana.

Gray, A. L., Johnson, T. A., Ardell, J. L., & Massari, V. J. (2004). Parasympathetic control of the heart. II. A novel interganglionic intrinsic cardiac circuit mediates neural control of heart rate. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 96(6), 2273-2278.

Gray, R. A. (1999). What exactly are optically recorded "action potentials"? *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 10(11), 1463-1466.

Gray, R. A., Pertsov, A. M., & Jalife, J. (1998). Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. *Nature*, 392(6671), 75-78.

Guyton A. C. & Hall J. E. (2006). *Tratado de Fisiología Médica*. Madrid: McGraw-Hill.

Gwathmey, J. K., Slawsky, M. T., Perreault, C. L., Briggs, G. M., Morgan, J. P., & Wei, J. Y. (1990). Effect of exercise conditioning on excitation-contraction coupling in aged rats. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 69(4), 1366-1371.

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

Hamlin, R.L. (2007). Animal models of ventricular arrhythmias. *Pharmacology and Therapeutics*, 113(2), 276-95.

Hamra, M., & McNeil, R. S. (1997). Accentuated antagonism in canine subendocardium is not altered by chronic exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 29(8), 1013-1020.

Han, J., & Moe, G. K. (1964). Nonuniform recovery of excitability in ventricular muscle. *Circulation Research*, 14, 44-60.

Hardwick, J. C., Mawe, G. M., Parsons, R. L. (1995). Evidence for afferent fiber innervation of parasympathetic neurons of the guinea-pig cardiac ganglion. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 53(2-3), 166-174.

Hardwick, J. C., Southerland, E.M., Girasole, A.E., Ryan, S.E., Negrotto, S., & Ardell, J.L. (2012). Remodeling of intrinsic cardiac neurons: effects of β -adrenergic receptor blockade in guinea pig models of chronic heart disease. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303, R950–R958.

Hardwick, J.C., Baran, C.N., Southerland, E.M., & Ardell, J.L. (2009). Remodeling of the guinea pig intrinsic cardiac plexus with chronic pressure overload. *American Journal Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 297, R859–R866.

Harris, A. S., Estandia, A., & Tillotson, R. F. (1951). Ventricular ectopic rhythms and ventricular fibrillation following cardiac sympathectomy and coronary occlusion. *The American Journal of Physiology*, 165(3), 505–512.

Hassall, C. J., & Burnstock, G. (1986). Intrinsic neurones and associated cells of the guinea-pig heart in culture. *Brain Research*, 364(1), 102-113.

Hopkins, D. A., & Armour, J. A. (1984). Localization of sympathetic postganglionic and parasympathetic preganglionic neurons which innervate different regions of the dog heart. *The Journal of Comparative Neurology*, 229(2), 186-198.

Horackova, M., Armour, J.A., & Byczko, Z. (1999). Distribution of intrinsic cardiac neurons in whole-mount guinea pig atria identified by multiple neurochemical coding. A confocal microscope study. *Cell and Tissue Research*, 297(3), 409–421.

Hou, Y., Scherlag, B. J., Lin, J., Zhang, Y., Lu, Z., Truong, K., Patterson, E., Lazzara, R., & Jackman, W. M. (2007). Ganglionated plexi modulate extrinsic cardiac autonomic nerve input: effects on sinus rate, atrioventricular conduction, refractoriness, and inducibility of atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(1), 61–68.

Huang, M. H., Horackova, M., Negoescu, R. M., Wolf, S., & Armour, J. A. (1996). Polysensory response characteristics of dorsal root ganglion neurones that may serve sensory functions during myocardial ischaemia. *Cardiovascular Research*, 32(3), 503-515.

Husain, K., & Hazelrigg, S. R. (2002). Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: Effect of regular exercise on the heart. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1587(1), 75-82.

Ito, Y., Oyunzul, L., Seki, M., Fujino, O. T., Matsui, M., & Yamada, S. (2009). Quantitative analysis of the loss of muscarinic receptors in various peripheral tissues in M1-M5 receptor single knockout mice. *British Journal of Pharmacology*, 156(7), 1147-53.4

Jalife J., Delmar M., Anumonwo J., Berenfeld O. y Kalifa J. (2009). *Basic cardiac electrophysiology for the clinician* (2ª ed). Oxford: Wiley-Blackwell.

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

Jalife, J. (2006). Tiempo, espacio y frecuencia en la fibrilación ventricular. *Revista Española de Cardiología*, 59(9), 859-61.

Janse, M. J. & Wit, A. L. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. (1989). *Physiological Reviews*, 69(4), 1049-1169.

Kapa, S., Venkatachalam, K. L., & Asirvatham, S. J. (2010). The autonomic nervous system in cardiac electrophysiology: an elegant interaction and emerging concepts. *Cardiology in Review*, 18(6), 275–284.

Kember, G. C., Fenton, G. A., Armour, J. A., & Kalyaniwalla, N. (2001). Competition model for aperiodic stochastic resonance in a fitzhugh-nagumo model of cardiac sensory neurons. *Physical Review.E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 63(4 Pt 1), 041911.

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

- Kukanova, B., & Mravec, B. (2006). Complex intracardiac nervous system. *Bratislavske Lekarske Listy*, 107(3), 45-51.
- Kwan, Y. Y., Fan, W., Hough, D., Lee, J. J., Fishbein, M. C., Karagueuzian, H. S., & Chen, P. S. (1998). Effects of procainamide on wave-front dynamics during ventricular fibrillation in open-chest dogs. *Circulation*, 97(18), 1828-1836.
- Lee, J. J., Kamjoo, K., Hough, D., Hwang, C., Fan, W., Fishbein, M. C., & Chen, P. S. (1996). Reentrant wave fronts in Wiggers' stage II ventricular fibrillation. Characteristics and mechanisms of termination and spontaneous regeneration. *Circulation Research*, 78(4), 660-675.
- Lei, M., Zhang, H., Grace, A. A., & Huang, C. L. (2007). SCN5A and sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovascular Research*, 74(3), 356-365.
- Levey, A. I. (1993). Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sciences*, 52(5-6), 441-448.
- Levy, M. N. (1971). Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. *Circulation Research*, 29(5), 437-445.
- Levy, M. N., & Zieske, H. (1969). Effect of enhanced contractility on the left ventricular response to vagus nerve stimulation in dogs. *Circulation Research*, 24(3), 303-311.
- Levy, M. N., Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2006). *Berne y Levy. Fisiología* (4ª ed.). Elsevier Mosby.
- Levy, W. C., Cerqueira, M. D., Harp, G. D., Johannessen, K. A., Abrass, I. B., Schwartz, R. S., & Stratton, J. R. (1998). Effect of endurance exercise training on heart rate variability at rest in healthy young and older men. *The American Journal of Cardiology*, 82(10), 1236-1241.
- Liu, L., & Nattel, S. (1997). Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *The American Journal of Physiology*, 273(2 Pt 2), H805 - H816.

Liu, Y., Wang, S., Wang, C., Song, H., Han, H., Hang, P., Jiang, Y., Wei, L., Huo, R., Sun, L., Gao, X., Lu, Y., & Du, Z. (2013). Upregulation of M₃ muscarinic receptor inhibits cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *Journal of Translational Medicine*, 11, 209.

Maeda, A., Kubo, T., Mishina, M., & Numa, S. (1988). Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS letters*, 239(2), 339–342.

Maier, L. S., Barckhausen, P., Weisser, J., Aleksic, I., Baryalei, M., & Pieske, B. (2000). Ca⁽²⁺⁾ handling in isolated human atrial myocardium. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 279(3), H952-8.

Malpas, S. C. (2010). Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiology Review*, 90, 513–557.

Martins, J. B., & Zipes, D.P. (1980). Effects of sympathetic and vagal nerves on recovery properties of the endocardium and epicardium of the canine left ventricle. *Circulation Research*, 46(1), 100–110.

McAllen, R. M., & Spyer, K. M. (1976). The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat. *The Journal of Physiology*, 258(1), 187-204.

McEachern, C. G., Manning, G. W., & Hall, G. E. (1940). Sudden occlusion of coronary arteries following removal of cardiosensory pathways: experimental study. *Archives of Internal Medicine (Chicago)*, 65(4), 661–670.

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

Moe G. K., & Abildskov J. A. (1959). Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *American Heart Journal*, 58(1), 59-70.

Moe, G. K., & Mendez, C. (1962). Basis of pharmacotherapy of cardiac arrhythmias. *Modern Concepts of Cardiovascular Disease*, 31, 739-744.

Moe, G.K., Rheinboldt, W.C., & Abildskov J.A. (1964). A computer model of atrial fibrillation. *American Heart Journal*, 67, 200-220.

Morady, F., Kadish, A. H., Toivonen, L. K., Kushner, J. A., & Schmaltz, S. (1988). The maximum effect of an increase in rate on human ventricular refractoriness. *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE*, 11(12), 2223-2234.

Mountcastle V. (1974). *Fisiología Médica*. Méjico: Fournier.

Napolitano, I. M., Willman, V. L., Hanlon, C. R., & Cooper, T. (1965). Intrinsic innervation of the heart. *The American Journal of Physiology*, 208, 455-458.

Ng, G.A., Brack, K.E., & Coote, J.H. (2001). Effects of direct sympathetic and vagus nerve stimulation on the physiology of the whole heart—a novel model of isolated Langendorff perfused rabbit heart with intact dual autonomic innervation. *Experimental Physiology*, 86(3), 319–329.

Noakes, T.N., Higginson, L., & Opie, L.H. (1983). Physical training increases VF thresholds of isolated rat hearts during normoxia, hypoxia, and regional ischemia. *Circulation*, 67(1), 24–30.

Norris, J. E., Lippincott, D., & Wurster, R. D. (1977). Responses of canine endocardium to stimulation of the upper thoracic roots. *The American Journal of Physiology*, 233(6), H655-9.

Nouchi, H., Kaeriyama, S., Muramatsu, A., Sato, M., Hirose, K., Shimizu, N., Tanaka, H., & Shigenobu, K. (2007). Muscarinic receptor subtypes mediating positive and negative inotropy in the developing chick ventricle. *Journal of Pharmacological Sciences*, 103(1), 75-82.

Nylander, E., Sigvardsson, K., & Kilbom, A. (1982). Training-induced bradycardia and intrinsic heart rate in rats. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 48(2), 189-199

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

Opie, L. H. (1998). *The heart: Physiology, from cell to circulation* (3rd ed.). Philadelphia: Lippincott-Raven.

Osadchii, O. E. (2008). Subtype-selective blockade of cardiac muscarinic receptors inhibits vagal chronotropic responses in cats. *Pflügers Arch: European journal of physiology*, 455(5), 819-28.

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

Papka, R. E. (1976). Studies of cardiac ganglia in pre- and postnatal rabbits. *Cell and Tissue Research*, 175(1), 17-35.

Pardini, B. J., Patel, K. P., Schmid, P. G., & Lund, D. D. (1987). Location, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 20(2), 91-101.

Paulsen, W., Boughner, D. R., Ko, P., Cunningham, D. A., & Persaud, J. A. (1981). Left ventricular function in marathon runners: Echocardiographic assessment. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, 51(4), 881-886.

Pauza, D. H., Pauziene, N., Pakeltyte, G., & Stropus, R. (2002a). Comparative quantitative study of the intrinsic cardiac ganglia and neurons in the rat, guinea pig, dog and human as revealed by histochemical staining for acetylcholinesterase. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, 184(2), 125-136.

Pauza, D. H., Skripka, V., & Pauziene, N. (2002b). Morphology of the intrinsic cardiac nervous system in the dog: a whole-mount study employing histochemical staining with acetylcholinesterase. *Cells, Tissues, Organs*, 172(4), 297-320.

Pauza, D. H., Skripka, V., Pauziene, N., & Stropus, R. (2000). Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart. *The Anatomical Record*, 259(4), 353-382.

Pelechano, F. (2008). Efectes electrofisiològics miocàrdics intrínsecs sobre l'automatisme, la conducció i la refractarietat produïts per la realització d'un protocol d'entrenament. Estudi experimental. Tesis doctoral. Universitat de València.

Pelliccia, A., Maron, B. J., Spataro, A., Proschan, M. A., & Spirito, P. (1991). The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *The New England Journal of Medicine*, 324(5), 295-301.

Peralta, E. G., Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Smith, D. H., Ramachandran, J., & Capon, D. J. (1987). Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *The EMBO Journal*, 6(13), 3923–3929.

Porter, T. R., Eckberg, D. L., Fritsch, J.M., Rea, R.F., Beightol, L.A., Schmedtjem, J.F., Jr, & Mohanty, P.K. Autonomic pathophysiology in heart failure patients. Sympathetic-cholinergic interrelations. *The Journal Clinical Investigation*, 85, 1362–1371.

Prystowsky, E. N., Grant, A. O., Wallace, A. G., & Strauss, H. C. (1979). An analysis of the effects of acetylcholine on conduction and refractoriness in the rabbit sinus node. *Circulation Research*, 44(1), 112-120.

Quan, K. J., Lee, J. H., Van Hare, G. F., Biblo, L. A., Mackall, J. A., & Carlson, M. D. (2002). Identification and characterization of atrioventricular parasympathetic innervation in humans. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 13(8), 735-739.

Raffel, D. M., & Wieland, D. M. (2001). Assessment of cardiac sympathetic nerve integrity with positron emission tomography. *Nuclear Medicine and Biology*, 28(5), 541-559.

Randall W. C., Randall D.C., & Ardell J.L. (1991). Autonomic regulation of myocardial contractility. En Zucker I. H. & Gilmore J. P. (eds.), *Reflex Control of the Circulation*. Boston: CRC.

Randall, D. C., Brown, D. R., McGuirt, A. S., Thompson, G. W., Armour, J. A., & Ardell, J. L. (2003). Interactions within the intrinsic cardiac nervous system contribute to chronotropic regulation. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(5), R1066-75.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. & Flower, R. J. (2008). *Rang y Dale Farmacología* (6ª ed.). Elsevier.

- Rardon, D. P., & Bailey, J. C. (1983). Parasympathetic effects on electrophysiologic properties of cardiac ventricular tissue. *Journal of the American College of Cardiology*, 2(6), 1200-1209.
- Rerych, S. K., Anderson, P. A. W., & Scholz, P. M. (1978). Accuracy of left ventricular end-diastolic volume determinations using first pass radionuclide technique. *Journal of Nuclear Medicine*, 19(6), 726.
- Richardson, R. J., Grkovic, I., & Anderson, C. R. (2003). Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell and Tissue Research*, 314(3), 337-350.
- Roden, D. M., Balsler, J. R., George, A. L., Jr, & Anderson, M. E. (2002). Cardiac ion channels. *Annual Review of Physiology*, 64, 431-475.
- Rogers, J. M., Huang, J., Smith, W. M., & Ideker, R. E. (1999). Incidence, evolution, and spatial distribution of functional reentry during ventricular fibrillation in pigs. *Circulation Research*, 84(8), 945-954.
- Rosenblueth, A., & Simeone, F. A. (1934). The interrelations of vagal and accelerator effects on the cardiac rate. *American Journal of Physiology*, 110, 42-55.
- Rubart, M., & Zipes, D. P. (2005). Mechanisms of sudden cardiac death. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(9), 2305-2315.
- Sable, D. L., Brammell, H. L., Sheehan, M. W., Nies, A. S., Gerber, J., & Horwitz, L. D. (1982). Attenuation of exercise conditioning by beta-adrenergic blockade. *Circulation*, 65(4), 679-684.
- Saburkina, I., Gukauskienė, L., Rysevaite, K., Brack, K. E., Pauza, A. G., Pauziene, N., & Pauza, D. H. (2014). Morphological pattern of intrinsic nerve plexus distributed on the rabbit heart and interatrial septum. *Journal of Anatomy*, 224(5), 583-593.
- Saltin, B., Blomqvist, G., Mitchell, J. H., Johnson, R. L., Jr, Wildenthal, K., & Chapman, C. B. (1968). Response to exercise after bed rest and after training. *Circulation*, 38(5 Suppl), VII1-78.
- Samaan, A. (1935). The antagonistic cardiac nerves and heart rate. *J Physiol.*, 83(3), 332-340.

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

Scheinman, M. M. (1993). Atrioventricular nodal conduction and refractoriness. *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE*, 16(3 Pt 2), 592-598.

Shen, M. J., & Zipes, D. P. (2014). Role of the Autonomic Nervous System in Modulating Cardiac Arrhythmias. *Circulation Research*, 114(6), 1004-1021.

Shen, M. J., Choi, E. K., Tan, A. Y., Lin, S. F., Fishbein, M. C., Chen, L. S., & Chen, P. S. (2012). Neural mechanisms of atrial arrhythmias. *Nature Reviews. Cardiology*, 9(1), 30–39.

Shen, M. J., Shinohara, T., Park, H. W., Frick, K., Ice, D. S., Choi, E. K., Han, S., Maruyama, M., Sharma, R., Shen, C., Fishbein, M. C., Chen, L. S., Lopshire, J. C., Zipes, D. P., Lin, S. F., & Chen, P. S. (2011). Continuous low-level vagus nerve stimulation reduces stellate ganglion nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmias in ambulatory canines. *Circulation*, 123(20), 2204–2212.

Shi, X., Stevens, G. H., Foresman, B. H., Stern, S. A., & Raven, P. B. (1995). Autonomic nervous system control of the heart: Endurance exercise training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 27(10), 1406-1413.

Singh, S., Johnson, P. I., Javed, A., Gray, T. S., Lonchyna, V. A., & Wurster, R. D. (1999). Monoamine- and histamine-synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia. *Circulation*, 99(3), 411-419.

Skinner, J. S., Gaskill, S. E., Rankinen, T., Leon, A. S., Rao, D. C., Wilmore, J. H., & Bouchard, C. (2003). Heart rate versus %VO₂max: Age, sex, race, initial fitness, and training response--HERITAGE. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 35(11), 1908-1913.

Slavikova, J. (1997). Distribution of peptide-containing neurons in the developing rat right atrium, studied using immunofluorescence and confocal laser scanning. *Neurochemical Research*, 22(8), 1013-1021.

Slavikova, J., Kuncova, J., Reischig, J., & Dvorakova, M. (2003). Catecholaminergic neurons in the rat intrinsic cardiac nervous system. *Neurochemical Research*, 28(3-4), 593-598.

Steele, P. A., Gibbins, I. L., Morris, J. L., & Mayer, B. (1994). Multiple populations of neuropeptide-containing intrinsic neurons in the guinea-pig heart. *Neuroscience*, 62(1), 241-250.

Stein, R. A., Michielli, D., Fox, E. L., & Krasnow, N. (1978). Continuous ventricular dimensions in man during supine exercise and recovery. An echocardiographic study. *The American Journal of Cardiology*, 41(4), 655-660.

Stein, R., Medeiros, C. M., Rosito, G. A., Zimmerman, L. I., & Ribeiro, J. P. (2002). Intrinsic sinus and atrioventricular node electrophysiologic adaptations in endurance athletes. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(6), 1033-1038.

Stewart, A. J., Allen, J. D., Devine, A. B., & Adgey, A. A. (1996). Effects of blockade of fast and slow inward current channels on ventricular fibrillation in the pig heart. *Heart (British Cardiac Society)*, 76(6), 513-519.

Such, L., Alberola, A. M., Such-Miquel, L., Lopez, L., Trapero, I., Pelechano, F., & Chorro, F. J. (2008). Effects of chronic exercise on myocardial refractoriness: A study on isolated rabbit heart. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 193(4), 331-339.

Such, L., Rodriguez, A., Alberola, A., Lopez, L., Ruiz, R., Artal, L., & Chorro, F. J. (2002). Intrinsic changes on automatism, conduction, and refractoriness by exercise in isolated rabbit heart. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 92(1), 225-229.

Such-Miquel, L., Chorro, F. J., Guerrero, J., Trapero, I., Brines, L., Zarzoso, M., Parra, G., Soler, C., Del Canto, I., Alberola, A., & Such, L. (2013). Evaluación de la complejidad de la activación miocárdica durante la fibrilación ventricular. Estudio experimental. *Revista Española de Cardiología*, 66(3), 177-184.

Taggart, P., Critchley, H., & Lambiase, P. D. (2011). Heart-brain interactions in cardiac arrhythmia. *Heart(British Cardiac Society)*, 97(9), 698-708.

Tan, A. Y., Li, H., Wachsmann-Hogiu, S., Chen, L. S., Chen, P. S., & Fishbein, M. C. (2006). Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction: implications for catheter ablation of atrial-pulmonary vein junction. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(1), 132–143.

Tanaka, K., Takanaga, A., Hayakawa, T., Maeda, S., & Seki, M. (2001). The intrinsic origin of nitric oxide synthase immunoreactive nerve fibers in the right atrium of the guinea pig. *Neuroscience Letters*, 305(2), 111-114.

Tibbits, G. F., Barnard, R. J., Baldwin, K. M., Cugalj, N., & Roberts, N. K. (1981). Influence of exercise on excitation-contraction coupling in rat myocardium. *The American Journal of Physiology*, 240(4), H472-80.

Vance, W. H., & Bowker, R.C. (1983). Spinal origins of cardiac afferents from the region of the left anterior descending artery. *Brain Research*, 258(1), 96–100.

Weiss, J. N. (2004). Ventricular fibrillation. New insights into mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1015, 122-132.

Weiss, J. N., Garfinkel, A., Karagueuzian, H. S., Qu, Z., & Chen, P. S. (1999). Chaos and the transition to ventricular fibrillation: A new approach to antiarrhythmic drug evaluation. *Circulation*, 99(21), 2819-2826.

West J. B. (1998). *Bases fisiológicas de la práctica médica* (12ª ed). Madrid: Panamericana.

Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R., & Allessie, M. A. (1995). Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*, 92(7), 1954-1968.

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

Witkowski, F. X., Leon, L. J., Penkoske, P. A., Giles, W. R., Spano, M. L., Ditto, W. L., & Winfree, A. T. (1998). Spatiotemporal evolution of ventricular fibrillation. *Nature*, 392(6671), 78-82.

Yuan, B. X., Ardell, J. L., Hopkins, D. A., & Armour, J. A. (1993). Differential cardiac responses induced by nicotine sensitive canine atrial and ventricular neurones. *Cardiovascular Research*, 27(5), 760-769.

Yuan, B. X., Ardell, J. L., Hopkins, D. A., Losier, A. M., & Armour, J. A. (1994) Gross and microscopic anatomy of the canine intrinsic cardiac nervous system. *The Anatomical Record*, 239(1), 75-87.

Zaitsev, A. V., Berenfeld, O., Mironov, S. F., Jalife, J., & Pertsov, A. M. (2000). Distribution of Excitation Frequencies on the Epicardial and Endocardial Surfaces of Fibrillating Ventricular Wall of the Sheep Heart. *Circulation Research*, 86(4), 408-417.

Zaitsev, A. V., Guha, P. K., Sarmast, F., Kolli, A., Berenfeld, O., Pertsov, A. M., & Jalife, J. (2003). Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circulation Research*, 92(5), 546-553.

Zarzoso, M. (2011). Modificaciones del automatismo, conducción, refractariedad miocárdicas y del patrón fibrilatorio ventricular producidas por el ejercicio físico crónico: influencia del sistema nervioso cardíaco. Tesis doctoral. Universitat de València.

Zarzoso, M., Such-Miquel, L., Parra, G., Brines-Ferrando, L., Such, L., Chorro, F.J., Guerrero, J., Guill, A., O'Connor, J.E., & Alberola, A. (2012). The training-induced changes on automatism, conduction and myocardial refractoriness are not mediated by parasympathetic postganglionic neurons activity. *European Journal of Applied Physiology*, 112(6), 2185-93.

Zhou, X., Ideker, R. E., Blichington, T. F., Smith, W. M., & Knisley, S. B. (1995). Optical transmembrane potential measurements during defibrillation-strength shocks in perfused rabbit hearts. *Circulation Research*, 77(3), 593-602.

Zipes, D. P. & Jalife, J. (2006). Arritmias. *Electrofisiología cardíaca* (6ª ed.).Marbán.

Zipes, D. P. (2008). Heart-brain interactions in cardiac arrhythmias. Role of the autonomic nervous system. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 75(Suppl 2), S94-S96.

Zipes, D. P., & Rubart, M. (2006). Neural modulation of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. *Heart Rhythm*, 3(1), 108–113.

Zipes, D. P., & Wellens, H. J. (1998). Sudden cardiac death. *Circulation*, 98(21), 2334-2351.

Zipes, D. P., Mihalick, M. J., & Robbins, G.T. (1974). Effects of selective vagal and stellate ganglion stimulation of atrial refractoriness. *Cardiovascular Research*, 8(5), 647–655.