

# **ESTUDI EXPERIMENTAL DELS EFECTES DE L'ENTRENAMENT FÍSIC SOBRE L'ENERGIA NECESSÀRIA PER REVERTIR LA FIBRIL·LACIÓ VENTRICULAR EN MODEL DE CONILL AÏLLAT.**



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

## **Treball Final de Màster Màster en Enginyeria Biomèdica**

**Autor:** Eduardo José Roses Albert

**Directors:** José Millet Roig  
Luis Such Belenguer

**Data:** juliol 2010



# ÍNDEX

ÍNDEX.....	1
ÍNDEX DE FIGURES .....	
ÍNDEX DE TAULES .....	
<b>1 INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJECTIUS .....	1
1.2 ANTECEDENTS .....	2
1.2.1 Efectes de l'exercici físic crònic: Generalitats .....	2
1.2.2 Efectes cardíacs de l'exercici físic crònic.....	5
1.2.3 Anàlisi de característiques de la fibril·lació ventricular .....	12
1.3 HIPÒTESI DE TREBALL .....	16
1.4 PLA DE TREBALL.....	17
<b>2 MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>20</b>
2.1 MATERIAL .....	21
2.1.1 Animals d'experimentació .....	21
2.1.2 Reactius .....	21
2.1.3 Instrumentació.....	22
2.1.4 Programari.....	34
2.2 MÈTODES.....	36
2.2.1 Grups d'estudi .....	36
2.2.2 Protocol d'entrenament dels animals.....	36
2.2.3 Estudi electrofisiològic.....	38
2.2.4 Processat digital del senyal .....	45
2.3 ANÀLISI ESTADÍSTICA .....	58
2.3.1 Test t d'Student .....	58
2.3.2 Test $\chi^2$ de Pearson.....	59
2.4 LEGISLACIÓ .....	60
<b>3 RESULTATS .....</b>	<b>62</b>
3.1 ENERGIA LLINDAR DE DESFIBRIL·LACIÓ.....	62
3.1.1 Energia Llindar Desfibril·latoria Immediata (ELDI) .....	64
3.2 RECURRÈNCIA DE LA FIBRIL·LACIÓ VENTRICULAR .....	65
3.3 ANÀLISI TEMPORAL: ENTROPIA .....	66
3.4 ANÀLISI FREQUÈNCIAL: FREQUÈNCIA DOMINANT I CONCENTRACIÓ ESPECTRAL .....	67
3.5 RESUM DE RESULTATS ESTADÍSTICS .....	68
<b>4 DISCUSSIÓ .....</b>	<b>70</b>
4.1 CONSIDERACIONS RESPECTE A LA METODOLOGIA.....	70
4.2 CONSIDERACIONS RESPECTE ALS RESULTATS.....	73
4.2.1 Respecte a l'energia necessària per a revertir el procés fibril·latori .....	73
4.2.2 Respecte a la recurrència total de la fibril·lació ventricular.....	74
4.3 LIMITACIONS DE L'ESTUDI .....	76
<b>5 CONCLUSIONS .....</b>	<b>78</b>

<b>6</b>	<b>LÍNIES FUTURES</b> .....	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>CONTRIBUCIONS</b> .....	<b>82</b>
7.1	PUBLICACIONS .....	82
7.2	PROJECTES D'INVESTIGACIÓ, .....	83
<b>8</b>	<b>ANNEXES</b> .....	<b>85</b>
8.1	DESENVOLUPAMENT MATEMÀTIC DE L'ESTIMADOR PERIODOGRAMA.....	85
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>89</b>

## Índex de figures

FIGURA 1. INTERRELACIONS QUE IMPLIQUEN LA RESPOSTA A L'ENTRENAMENT. MODIFICAT DE LAMB, 1989.....	2
FIGURA 2. SISTEMA DE TAPÍS RODANT DE PANLAB® S.L. ....	22
FIGURA 3. CROQUIS DE DISPOSICIÓ DE LA INSTRUMENTACIÓ D'UN SISTEMA DE PERFUSIÓ .....	23
FIGURA 4. DETALL DE LA UBICACIÓ DE LA PREPARACIÓ PER AL MODEL AMB COR AÏLLAT DE CONILL.....	24
FIGURA 5. ESQUEMA D'UNA PREPARACIÓ DE COR AÏLLAT DE CONILL.....	25
FIGURA 6. ESTIMULADOR GRASS S88 (VISTA FRONTAL I DETALL) .....	26
FIGURA 7. SISTEMA MAPTECH (A), MULTIELÈCTRODE 16X16 UNIPOLARS (B) , DISPOSICIÓ DE REGISTRE SOBRE EPICARDI (C).....	27
FIGURA 8. FRONTAL DE L'INTERFÍCIE DE L'EQUIP DESFIBRIL·LADOR.....	29
FIGURA 9. CIRCUITERIA INTERNA DEL DESFIBRIL·LADOR.....	29
FIGURA 10. FORMA D'ONA MONOFÀSICA (BLAU) I BIFÀSICA I NIVELLS RELATIUS .....	30
FIGURA 11. FORMES D'ONA BASADES EN L'EXPONENCIAL TRUNCADA (MONOFÀSICA, BIFÀSICA I BIFÀSICA PULSÀTIL) .....	31
FIGURA 12. ESQUEMÀTIC DEL PRINCIPÍ DE FUNCIONAMENT ELECTRÒNIC DEL DESFIBRIL·LADOR .....	32
FIGURA 13. PARÀMETRES DELS DIFERENTS TIPUS D'ONA SELECCIONABLE .....	32
FIGURA 14. DISTINTS INSTANTS DE LA PREPARACIÓ EXPERIMENTAL.....	38
FIGURA 15. SISTEMES IMPLICATS EN L'EXPERIMENT: SISTEMA DE PERFUSIÓ I SISTEMA DE REGISTRE/ESTIMULACIÓ .....	42
FIGURA 16. INSTANT DE LA DESFIBRIL·LACIÓ I DETALL DE L'APLICACIÓ SOBRE LA PREPARACIÓ .....	42
FIGURA 17. EGM DURANT RITME SINUSAL.....	45
FIGURA 18. ELECTROGRAMA UNIPOLAR.....	47
FIGURA 19. ELECTROGRAMA BIPOLAR .....	47
FIGURA 20. REGISTRE ON S'HI MOSTREN FINS A QUATRE CANALS I ELS RESPECTIUS EGMs.....	47
FIGURA 21. EXEMPLE DE CÀLCUL DE LA DETERMINACIÓ DE LA FREQUÈNCIA DOMINANT DE L'FV .....	55
FIGURA 22. DIAGRAMA DE FLUX DE LES FUNCIONS PROGRAMADES AMB MATLAB®.....	57
FIGURA 23. COMPARATIVA DEL LLINDAR DESFIBRIL·LATORI IMMEDIAT .....	64
FIGURA 24. ENTROPIES DEL SENYALS D'FV EN LA PRIMERA FASE DEL PROTOCOL .....	66
FIGURA 25. COMPARATIVA DE FREQUÈNCIES DOMINANTS PER A CONTROLS I ENTRENATS.....	67

## Índex de taules

TAULA 1. EFECTES CARDÍACS GENERALS DE L'ENTRENAMENT (PRES DE MOFFAT I MOTTRAM, 1987). ....	7
TAULA 2. VARIABLES D'ENTRADA DE LA FUNCIÓ "PWELCH" .....	54
TAULA 3. TAULA DE CONTINGÈNCIA 2X2.....	59
TAULA 4. VALORS DE LLINDAR DESFIBRIL·LATORI I DE RECURRÈNCIA PER AL GRUP CONTROL.....	63
TAULA 5. VALORS DE LLINDAR DESFIBRIL·LATORI I DE RECURRÈNCIA PER AL GRUP ENTRENAT .....	63
TAULA 6. ESTADÍSTIC KHI QUADRAT DE LA RECURRÈNCIA .....	65
TAULA 7. TAULA RESUM DELS ESTADÍSTICS I LA SIGNIFICACIÓ DELS PARÀMETRES ESTUDIATS .....	68

# 1. INTRODUCCIÓ

# 1 INTRODUCCIÓ

## 1.1 Objectius

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

- 1) L'energia mínima necessària (energia llindar) per a desfibrillar episodis de fibril·lació ventricular.
- 2) La recurrència total de la fibril·lació ventricular.
- 3) Relacionar els efectes fisiològics de l'entrenament físic amb els paràmetres de reversió d'una fibril·lació ventricular.

Com a objectius complementaris del present estudi, derivats del tercer objectiu principal, ens proposarem extraure, mitjançant processat digital del senyal, dos dels principals paràmetres de caracterització de la fibril·lació ventricular, que són:

1. La freqüència dominant de la fibril·lació ventricular induïda, junt amb la concentració espectral al voltant d'aquesta.
2. L'estimació de l'entropia del senyal fibril·latori.

Aquests últims objectius han sigut plantejats per tractar de relacionar els resultats sobre llindar desfibril·latori i recurrència de la fibril·lació amb propietats electrofisiològiques deduïbles per l'anàlisi de la fibril·lació, com és l'heterogeneïtat miocardiaca.

## 1.2 Antecedents

### 1.2.1 Efectes de l'exercici físic crònic: Generalitats

En primer lloc, és convenient revisar algunes definicions i alguns conceptes que facilitaran la posterior comprensió del text i contribuiran a homologar el llenguatge que utilitzem habitualment.

Entenem per activitat física qualsevol moviment corporal produït pels músculs esquelètics que té com a resultat una despesa energètica per sobre del metabolisme basal (Caspersen et al. 1985). Així mateix, definim exercici físic com tota aquella activitat física planificada, estructurada i repetitiva que té per objectiu la millora o el manteniment d'un o més components de la forma física (Caspersen et al. 1985).

Als canvis morfològics i/o funcionals induïts per la realització regular (o crònica) d'exercici físic se'ls cataloga com adaptació fisiològica a l'esforç. Aquest procés d'adaptació a l'exercici i a l'entrenament són exemples de regulacions de realimentació negativa, aparentment produïdes per a ajudar al cos a minimitzar els canvis homeostàtics que ocorren durant l'exercici. (Lamb et al. 1989)

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

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

B) D'altra banda, la realització crònica d'exercici desenvolupa un tipus de senyal biològic que és detectat per l'organisme, i que el fa respondre de manera diferent front a l'exercici físic agut de com ho faria sense la realització prèvia d'exercici regular (condicions de gran demanda energètica i resposta muscular).

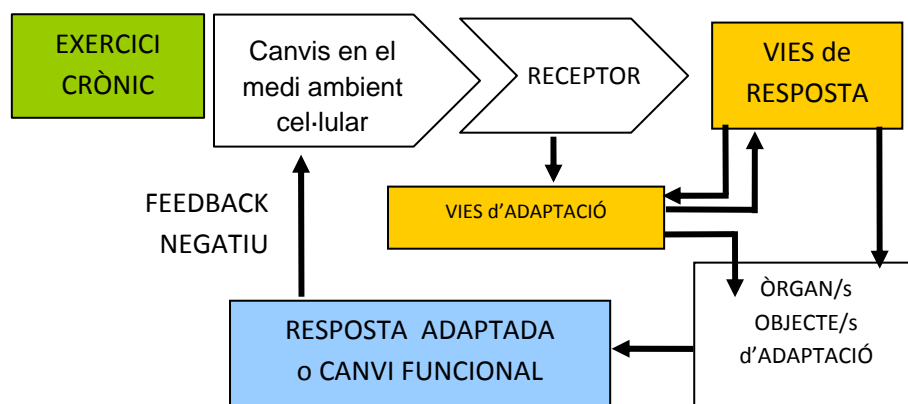


Figura 1. Interrelacions que impliquen la resposta a l'entrenament. Modificat de Lamb, 1989.



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

En el procés d'adaptació a l'entrenament (i en el de desadaptació o desentrenament), es produeixen desplaçaments d'equilibri entre processos de síntesi i de ruptura a nivell molecular, i en l'actualitat, constitueix un objectiu prioritari descobrir les rutes de senyalització que regulen aquestos balanços (Åstrand et al., 2003).

És important diferenciar entre adaptacions a l'exercici i respostes a l'exercici, així una adaptació és el canvi que apareix a llarg termini, que tarda més temps a desaparèixer i que es pot manifestar fins i tot en repòs, mentre que una resposta a l'exercici és una modificació aguda i immediata que experimenten els sistemes fisiològics davant d'un estímul, en aquest cas, la realització d'una activitat física. Així, l'entrenament aeròbic produeix adaptacions a diferents nivells: bioquímic, respiratori, cardiovascular, hormonal, neural i del sistema nerviós vegetatiu, muscular, sanguini, tèrmic i estructural (López-Chicharro i Fernández, 2001). A més, implica millores en diferents àrees i processos: màxima captació d'oxigen, funcions hemodinàmiques centrals, funció del sistema nerviós autònom, funció muscular i vascular perifèrica, i capacitat per a l'execució de l'exercici físic per davall del límit màxim (o capacitat submàxima). Totes aquestes adaptacions constitueixen una situació o estat d'entrenament, el qual permet a l'individu realitzar exercici de major càrrega de treball amb menors freqüències cardíques, a qualsevol nivell per davall del màxim d'exercici (Fletcher et al., 2001).

Es tracta tant de canvis de caràcter bioquímic, com de funcions fisiològiques que impliquen als diversos òrgans i sistemes funcionals entre les què presenten especial importància les adaptacions cardiovasculars.

Entre els canvis bioquímics cal destacar:

- a) augment de la reserva dels substrats anaerobis i increment del dispositiu enzimàtic que opera sobre ells (Houston, 1977),
- b) menor ús del glucogen i de l'acumulació de lactat muscular i sanguini en exercicis submàxims,
- c) augment de la grandària i de la quantitat de mitocòndries (Barnard, 1970) i major capacitat per a la fosforilació oxidativa (Holloszy i Coyle, 1984);
- d) increment en les concentracions de fosfàgens i ATP, i de la mioglobina (Pattengale i Holloszy, 1967);
- e) major facilitat per a la mobilització i ús d'àcids grassos (Riviere, 1989);

f) augment de la capacitat per a fer glucòlisi aeròbia; en general, en el procés d'adaptació a l'exercici físic o entrenament i en el de desadaptació o desentrenament, es produeix desplaçament d'equilibri entre processos de síntesi i de ruptura a nivell, i en l'actualitat, constitueix un objectiu prioritari descobrir les rutes de senyalització que regulen este balanç (Åstrand et al., 2003).

Així mateix es donen canvis respiratoris com són un augment del consum màxim d'oxigen i del volum per minut a costa del volum corrent (Selkurt 1984).

També es produeixen augments de la capacitat de difusió dels gasos en el sector alveolo-capil·lar, la qual cosa pareix estar relacionada amb una superfície alveolo-capil·lar més extensa i, a la vegada, amb una major capacitat de difusió (Bouchard, 1992).

Especialment importants són els canvis que afecten la fisiologia del Sistema Nerviós com ara:

- a) una disminució del to de la divisió simpàtica amb nivells sanguinis i/o urinaris de catecolamines més baixos en repòs (Hartley et al., 1972, citats per Fletcher et al., 2001, Bowers et al. 1995, Hespel et al., 1988, Kjaer et al., 1986);
- b) un augment de la sensibilitat a les catecolamina (Schaible i Scheuer, 1985)

Clàssicament ha sigut atribuït a l'exercici físic regular un increment del to parasimpàtic (Scheuer i Tipton, 1977, Billman i Kukielka, 2006),

Finalment comentarem alguns aspectes relacionats amb el sistema endocrí que es produeixen quan els entrenaments han sigut de llarga duració (anys), la qual cosa no ocorre quan l'entrenament s'ha produït en curts períodes de temps (Åstrand et al., 2003). Es produeixen canvis en la sensibilitat a les diferents hormones per part de les cèl·lules sobre les quals actuen, com a conseqüència de l'entrenament (Åstrand et al., 2003) com és el cas paradigmàtic de la insulina i els seus receptors en teixit adipós i muscular (James et al., 1985). "L'entrenament físic, practicat de forma habitual i amb fins esportius, produeix profunds efectes sobre el sistema hormonal de les dones i efectes transitoris sobre la capacitat de reproducció femenina" (González, 1992) havent-se detectat "oligomenorrea, amenorrea i retard en la menarquia en atletes entrenades i habituades a l'entrenament físic. Respecte a les modificacions cardiovasculars per l'exercici físic regular les deslligarem d'aquest apartat per a fer una consideració especial en el següent.

## 1.2.2 Efectes cardíacs de l'exercici físic crònic

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

Una de les modificacions més clares, com a continuació tractarem, es produeix en la freqüència cardíaca dels individus entrenats en comparació amb els sedentaris. Ja hem fet alguna menció en línies anteriors que la freqüència cardíaca submàxima disminueix també amb l'entrenament, i que aquesta s'acompanya generalment d'un augment del volum sistòlic.

### 1.2.2.1 Efectes distints als electrofisiològics

És possible que, en la persona entrenada, l'augment de la despesa cardíaca es pose de manifest més per un augment en la despesa sistòlica que degut a l'increment de la freqüència cardíaca, ja que la freqüència cardíaca màxima normalment no augmenta en les persones sanes (Hartley et al., 1969).

A nivell cardiovascular, una adaptació central és la major despesa cardíaca que es pot aconseguir amb un exercici màxim, a diferència dels valors submàxims que no solen canviar (Saltin et al., 1968, citat per Fletcher et al., 2001), com en canvi sí ho fa la freqüència cardíaca submàxima per l'entrenament, acompanyada esta modificació de canvis concomitants del volum sistòlic.

La disminució de la freqüència cardíaca submàxima s'acompanya generalment d'un augment concomitant del volum sistòlic.

Com ja s'ha comentat, un dels canvis més significatius és el que es manifesta en la mesura del volum sistòlic.

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

Pelliccia et al. (1991), d'altra banda, van relatar que l'augment del volum sistòlic produït per l'entrenament de resistència, es troba relacionat amb l'engrandiment de la càmera cardíaca i amb el major ompliment de sang d'aquesta (Pelliccia et al. 1991).

Un altre mecanisme que s'ha tractat d'implicar en l'augment del volum sistòlic és l'augment de l'estat inotròpic del cor en els individus entrenats (Fletcher et al. 2001). Però l'evidència d'un augment de la contractilitat en subjectes entrenats durant l'exercici és quelcom contradictòria.

El què resulta evident és que l'entrenament produeix canvis en les dimensions cardíques; d'aquesta manera el grau d'hipertròfia miocàrdica es troba relacionat amb el tipus d'exercici per què s'ha entrenat el subjecte (Åstrand et al., 2003).

Així, Schaible i Scheuer (1985), van relatar que en atletes de resistència es va produir un augment de la grandària miocàrdica junt amb certs canvis electrocardiogràfics i fonocardiogràfics, d'on deriva el concepte de la "síndrome del cor de l'atleta". Aquests canvis poden ocórrer en qüestió d'algunes setmanes (Saltin et al., 1968), però el manteniment de l'augment de la grandària cardíaca inclús després d'un cert temps de relativa inactivitat, requereix haver-s'hi entrenat intensivament durant diversos anys, tal com van assenyalar en una revisió al respecte Blomqvist i Saltin (1983).

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

En la següent taula es presenta, de manera orientativa, el que suposen algunes de les diferències que acabem de citar, entre els subjectes entrenats i els no entrenats.

	NO ENTRENATS		ENTRENATS	
	REPÒS	EXERCICI	REPÒS	EXERCICI
Freqüència (batec/min)	72	180	40	180
Volum sistòlic (ml/min)	70	100	140	190
Despesa cardíaca (l/min)	5	18	5.6	35
Volum telediastòlic (ml)	145	160	200	220
Volum telesistòlic (ml)	75	60	60	30
Temps de diàstole (s)	0.53	0.13	1.1	0.08
Temps de sistole (s)	0.3	0.2	0.4	0.2

**Taula 1. Efectes cardíacs generals de l'entrenament (pres de Moffat i Mottram, 1987).**

### 1.2.2.2 Efectes electrofisiològics

El sistema nerviós autònom influeix notablement en el node SA, en l'aurícula i en el node AV, atribuint-se per alguns autors als efectes vagals la responsabilitat de la disminució de l'automatisme del node SA, la disminució de la conducció i la prolongació del període refractari del teixit que el rodeja (Pelechano, 2008). D'altra banda, el sistema nerviós simpàtic exerceix efectes contraris en aquestes propietats (Harrison i Wilson, 1991).

La pràctica regular d'exercici físic de resistència produeix canvis en diversos paràmetres electrofisiològics cardiovasculars en repòs, sent especialment significatius els canvis sobre l'automatisme i la conducció.

#### 1.2.2.2.1 Automatisme

Una característica clàssicament descrita de l'efecte de l'entrenament aeròbic sobre les adaptacions cardiovasculars és la disminució de la freqüència cardíaca en repòs i durant exercicis submàxims a valors francament inferiors als que exhibeixen els individus sedentaris (Blumenthal et al., 1990).

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

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

#### 1.2.2.2.2 Conducció

No sols el cronotropisme està deprimat com a conseqüència de l'entrenament, sinó també el dromotropisme (velocitat de conducció), la qual cosa es manifesta en la conducció AV (Talan et al., 1982, Viitasalo et al., 1982 i Viitasalo et al., 1984). Diversos estudis han comprovat la contribució del sistema nerviós autònom i de mecanismes miocàrdics sobre els canvis electrofisiològics observats en humans i en animals de laboratori entrenats. Stein et al. (2002), també van estudiar en atletes ben entrenats els efectes de l'entrenament sobre la conducció AV no controlada pel sistema nerviós autònom.

Aquests autors van trobar que tant la longitud del cicle de Wenckebach com la longitud de l'interval A-V eren més llargs en els atletes que en els subjectes control. Such et al. (2002) observaren que l'entrenament produeix una depressió de la conducció del node auriculoventricular en el cor aïllat de conill i per tant no sotmès a control vagal central.

Respecte a la conducció en miocardi ventricular, les dades de que disposem són les obtingudes en el nostre laboratori, i en les què no pareix que l'exercici físic crònic produïska cap modificació (López 2008, Pelechano 2008).

#### 1.2.2.2.3 Refractarietat

Són pocs els estudis referents als efectes de l'exercici físic crònic sobre la refractarietat miocàrdica.

Mezzani et al. (1990), en subjectes que tenien una via auriculoventricular accessòria i un Wolff-Parkinson-White, trobaren un augment en el període refractari efectiu i funcional auricular en subjectes entrenats respecte als què no eren entrenats. En canvi, Brorson et al. (1976) no trobaren modificacions en el període refractari efectiu auricular en subjectes entrenats, malgrat tot i que, van observar un augment de la duració del potencial d'acció monofàsic auricular que està directament relacionat amb la refractarietat.

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

En un article publicat recentment per nosaltres es posa de relleu un increment de la refractarietat ventricular en cor aïllat de conill sotmès a un protocol d'exercici físic crònic sobre tapis rodant (Such et al. 2008).

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

#### 1.2.2.2.4 Heterogeneïtat

Moe i Abildskov en 1959 (Jalife, 2000) provaren que la fibril·lació ventricular, independentment de les causes què l'originaren, podia auto sustentar-se i mantenir-se en un estat estable, per a la qual cosa es requeria

l'existència de repolaritzacions no homogènies en el teixit miocardiàc. Tanmateix, es demostrà que l'heterogeneïtat dels períodes refractaris miocardiàcs, a més de l'esmentada heterogeneïtat en la repolarització, era un factor de gran importància per a la inducció de la fibril·lació. La possibilitat de que l'activitat reentrant romanés periòdica i no degenerara en fibril·lació es demostrà que no tenia lloc en absència d'heterogeneïtat en els períodes refractaris.

Pel que fa a l'entrenament físic, l'adaptació a aquest, sembla disminuir l'heterogeneïtat electrofisiològica del miocardi ventricular a la vista de les observacions realitzades en cor aïllat de conill (perfós de manera normal) sotmés a exercici físic sobre tapis rodant (Pelechano et al. 2007). Així mateix, l'exercici físic manté l'estabilitat electrofisiològica ventricular en model similar a l'anterior (Such-Miquel et al. 2008).

D'igual manera, pel que sembla, també la realització d'exercici físic regular disminueix l'heterogeneïtat miocàrdica produïda per l'isquèmia aguda (Parra et al. 2009), tot en experiments amb cor aïllat de conill.

Hajnal et al. (2005) demostraren, en gossos sotmesos a un protocol d'exercici físic que disminuïa l'heterogeneïtat electrofisiològica deguda a l'oclusió arterial coronària aguda.

Les anteriors observacions apunten a que l'heterogeneïtat electrofisiològica del cor, què es dona en condicions fisiològiques i què augmenta com a conseqüència de diversos processos fisiopatològics (Kléber i Rudy et al. 2004), sembla poder-se modificar en un sentit beneficiós com raonarem a continuació. No obstant, són pocs els treballs d'investigació que fan referència a la capacitat de l'exercici per aconseguir una major homogeneïtat al cor.



### *1.2.2.3 Derivats dels anteriors i la seua relació amb la protecció oferta per l'exercici físic*

En el present apartat procedirem a tractar la relació que pareixen tindre dos dels paràmetres susceptibles de modificació per l'efecte de l'adaptació a l'exercici físic crònic: la refractarietat i, molt especialment, l'heterogeneïtat electrofisiològica del miocardi.

Els mecanismes de la desfibril·lació (els què estan directament lligats a l'objectiu del present treball) continuen sent objecte de debat en la actualitat, malgrat el gran nombre de treballs d'investigació realitzats fins al present (Chen et al. 1998, Dillon et al. 1998, Efimov et al. 1998, Chattipakorn et al. 2001).

En opinió d'alguns autors, la facilitat per a desfibril·lar guarda relació amb la capacitat que tenen els xocs elèctrics per prolongar la repolarització, sincronitzar-la i disminuir la dispersió de la mateixa (Dillon 1992, Knisley et al. 1992), malgrat que hi ha estudis en els què, utilitzant una sèrie de paràmetres d'heterogeneïtat com és la dispersió del temps transcorregut des de l'aplicació del xoc fins al 90% de la repolarització del potencial d'acció immediat en el post-xoc, no trobaren relació entre l'èxit o el fracàs de la desfibril·lació i l'esmentada heterogeneïtat (Chattipakorn et al. 2001).

La dispersió de la duració del potencial d'acció transmural, que resulta de les variacions de les propietats iòniques cel·lulars, es sap que modula el substrat aritmogènic (Antzelevitch i Fisch 2001 esmentats per Maharaj et al. 2008) i podria jugar un paper en el resultat de la teràpia antiaritmica.

Així mateix, ha estat publicat que el límit superior de vulnerabilitat, definit com la més alta intensitat de xoc per damunt de la qual no pot ser induïda ninguna arítmia, està relacionat amb la dispersió de la repolarització post-xoc, facilitant-se la instauració de processos reentrants (Maharaj et al. 2008).

Si lliguem estes consideracions amb els efectes que l'exercici físic crònic pareix exhibir sobre l'heterogeneïtat electrofisiològica miocàrdica i també sobre la refractarietat miocàrdica, sembla raonable plantejar la hipòtesi de treball que desenvolupem en el següent apartat.

Es per això que, els nostres resultats sobre la determinació de l'energia necessària per a desfibril·lar podrien estar relacionats, en part, amb els efectes beneficiosos de l'exercici físic sobre l'heterogeneïtat del miocardi, que es mostren en aquest estudi.

### 1.2.3 Anàlisi de característiques de la fibril·lació ventricular

Diferents autors han correlacionat algunes característiques de la fibril·lació ventricular amb la major o menor malignitat de la mateixa. Segons es desprèn d'aquestes investigacions, hi ha una relació entre algunes de les característiques de la fibril·lació ventricular i la millor o pitjor situació en què quedaria el cor després de la desaparició de la mateixa, en aquells casos en què s'instaura l'arítmia d'una manera sobtada. A continuació exposarem breument els estudis realitzats que considerem més significatius.

#### 1.2.3.1 Domini temporal: entropia del senyal de la fibril·lació ventricular

Tradicionalment s'ha pensat que la instauració de la fibril·lació ventricular era un procés estocàstic. Recentment, Witkowski et al. (1995) i Gray et al. (1998) han demostrat que hi existeix cert determinisme durant aquesta arítmia i, fins i tot, han descrit un patró temps-espai de l'activitat elèctrica en cors aïllats i perfosos d'animals.

En l'actualitat, hi existeixen una gran quantitat de mètodes d'estimació de la complexitat d'un sistema no lineal, per exemple els mètodes de dimensions, els exponents de Lyapunov o l'estimació d'entropies. Els índexs per a l'anàlisi de sistemes deterministes no lineals són valuosos sobretot en l'avaluació de sèries de temps de senyals fisiològics, degut a que, a sovint, hi podem extraure informació oculta relacionada amb mecanismes subjacents (Alcaraz et al., 2010, Pincus et al., 1994, Richman et al., 2000).

Les mesures basades en el càlcul de l'entropia són considerades com un tipus més d'estimador estadístic aplicable tant a processos deterministes com estocàstics. Donat l'origen determinista no lineal de la gran majoria dels processos dinàmics involucrats en la fisiologia dels sistemes biològics en general, i de la fibril·lació en particular, el càlcul de l'entropia com estimador pot resultar de gran utilitat.

Tot i això, l'entropia per definició, presenta limitacions en la seua aplicació, associades principalment a la insuficiència de informació (mostres o dades) deguda a la duració finita dels registres (Chen et al., 2009) i a la presència de soroll estocàstic indefinit (Yu et al., 2000)

Per tal de solventar aquestos inconvenients, Pincus (1991) definí l'entropia aproximada (ApEn) com un estimador de la complexitat aplicable a registres de tamany mostral mitjà, finits i sorollosos (Pincus et al., 1991)

En essència l'ApEn determina la probabilitat condicionada de la versemblança entre un segment de mostres i un següent segment d'igual duració. Com més alta és aquesta probabilitat, més menut és el valor de l'entropia aproximada, i per tant, la informació del registre més regular n'és (menys complexe).

Malgrat la popularitat i l'èxit del càlcul de l'ApEn en l'anàlisi de senyals fisiològiques en distints àmbits i aplicacions: estudis d'hipertensió

intracranial (Homero et al., 2005), extracció d'informació amb series de temps en pacients esquizofrènics (Homero et al., 2006), l'estudi de la variabilitat del ritme cardíac (Platisa et al., 2006), etc...; l'entropia aproximada presenta certs inconvenients com la dependència de la longitud de la mostra, el biaix o la incoherència relativa (Richman et al., 2000).

Aquestes deficiències han conduït als investigadors al desenvolupament de la que es coneix com l'entropia mostral (SampEn) (Richman et al., 2000). Aquest estimador: redueix el biaix, és independent de la durada de les sèries de temps, és més coherent que l'ApEn i, a més a més, simplifica el càlcul.

D'igual manera, aquest índex, també ha estat aplicat per analitzar senyals fisiològics en diversos estudis recents, com l'anàlisi de la variabilitat del ritme cardíac en presència de malaltia i de l'envelliment (Platisa et al., 2006), la caracterització de l'activitat en pacients amb malaltia d'Alzheimer (Abásolo et al., 2006), l'anàlisi de la influència de l'exercici de càrrega sobre la regularitat de les sèries temporals d'RR i la QT (Lewis et al., 2007) o en estudis de predicció (Alcaraz et al., 2008, Mainardi et al., 2004), organització (Alcaraz et al., 2009) i èxit desfibril·ladori (Alcaraz et al., 2008) de la fibril·lació auricular.

En el present treball, es planteja com un dels objectius complementaris analitzar l'entropia mostral del senyal de fibril·lació ventricular, ja que el càlcul de l'entropia ens aporta una estimació, en forma d'índex, de la regularitat del senyal (analitzat en el domini del temps). Aquest índex de regularitat manifesta doncs una idea de com d'organitzat és un senyal i per tant d'heterogeneïtat.

### *1.2.3.2 Domini freqüencial: freqüència dominant de la fibril·lació ventricular*

Strohmenger et al. (1997) van realitzar un estudi amb el propòsit d'analitzar, si en pacients amb fibril·lació ventricular extrahospitalària, la freqüència d'aquesta arítmia i l'amplitud de la mateixa eren predictives de cardioversió reeixida trobant que el major voltatge de la fibril·lació ventricular es va correlacionar amb unes millors possibilitats de cardioversió; mentre que la fibril·lació fina (fibril·lació de poca amplitud i alta freqüència) fou més rebel al tractament. Així mateix, es va correlacionar bé amb el resultat de la cardioversió la freqüència dominant de la fibril·lació ventricular, trobada gràcies a l'aplicació de la transformada ràpida de Fourier. És a dir, les possibilitats d'èxit s'observaren amb valors de freqüència dominant més alts, que aquells obtinguts en la fibril·lació ventricular, el tractament de la qual no havia estat exitós.

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

Els mètodes basats en l'anàlisi del domini de la freqüència, com ara les anàlisis de la densitat espectral de potència i de l'espectre de coherència, examinen la distribució de l'energia dels electrogrames com una funció de la freqüència (Ropella, 2001).

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

Diverses són les característiques del poder espectral que han estat analitzades en la fibril·lació ventricular, per establir el seu caràcter predictiu en relació amb les conseqüències de la mateixa després de la desfibril·lació.

Així, com relaten Gazmuri et al. (2001) en una revisió respecte d'això, han estat analitzades:

1. La freqüència mitjana, que és la freqüència que bisecciona l'espectre de potència (Strohmenger et al., 1997; Brown et al., 1991; citats per Gazmuri et al., 2001).
2. La freqüència límit, que és la freqüència per davall de la qual resideix el 95% de l'àrea de l'espectre de potència (Strohmenger et al., 1997, citat per Gazmuri et al., 2001).
3. L'anomenat índex AMSA (amplitud de l'àrea de l'espectre), que s'obté integrant l'àrea sota l'amplitud de l'espectre de freqüència dins d'un ample de banda que elimina certs artefactes o components sorolloses del senyal (Marn-Pernat et al., 2001).
4. La freqüència dominant, que correspon al màxim espectre de potència (Strohmenger et al., 1997, citat per Gazmuri et al., 2001).

Aquest últim paràmetre per a la valoració de la fibril·lació ventricular és el que es pretén utilitzar en el present treball. Junt amb aquest també s'hi calcula la concentració espectral entorn a aquesta freqüència dominant.

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

En el present treball, es planteja com un dels objectius complementaris analitzar la freqüència dominant de la fibril·lació ventricular induïda (junt amb la concentració espectral), després de la realització d'entrenament, ja que la freqüència dominant és una propietat que es correlaciona bé amb una altra propietat relacionada amb l'aparició d'arítmies per reentrada i amb la perpetuació de les mateixes, com és la refractarietat miocàrdica.

### 1.3 Hipòtesi de treball

En base a les anteriors consideracions, la nostra hipòtesi és que l'energia necessària per a desfibrillar un cor aïllat usant un desfibril·lador *ad hoc* que permet seleccionar amb alta resolució el llindar desfibril·lador, és menor en els cors provinents d'animals entrenats que en aquells pertanyents al grup control i que aquest resultat està relacionat amb la heterogeneïtat electrofisiològica del miocàrdi, estimada mitjançant tècniques de processat digital aplicades al senyal fibril·lador.

Així mateix, hipotetitzem que els cors provinents d'animals entrenats, en els quals ha estat induïda fibril·lació ventricular, són menys sensibles a la recurrència que aquells considerats com casos control y que aquest efecte també està relacionat amb la heterogeneïtat electrofisiològica del miocàrdi.

Aquestes hipòtesis de treball són les que plantegem com a finalitat última dels nostres objectius.

## 1.4 Pla de treball

Per tal d'aconseguir els nostres objectius, realitzem el següent pla de treball:

1. Treball previ: Familiarització amb l'estudi electrofisiològic i l'efecte de l'exercici físic, recerca de bibliografia i pressa de contacte (2 a 3 setmanes).
2. Seguiment del protocol de preparació dels grups d'estudi (5 a 6 mesos):
  - a. Entrenament dels conills sotmesos a estudi (grup entrenat), en tapís rodant.
  - b. Manteniment en estabulació (sense realització d'exercici físic forçat) d'un segon grup de conills (grup control), el mateix temps que dura el període d'entrenament en el grup d'animals entrenats.
3. Realització d'experiments amb animals i adquisició dels senyals electrogràfics (5 a 6 mesos):
  - a. Preparació experimental: anestèsia i sacrifici del conill, col·locació de la preparació, perfusió del cor i posicionament d'elèctrodes de registre.
  - b. Execució del protocol experimental:
    - i. Registres basals i mesures inicials.
    - ii. Inducció de fibril·lació ventricular mitjançant estimulació ventricular a freqüències creixents.
    - iii. Desfibril·lació en fase immediata (primera desfibril·lació) seguint el mètode d'aplicació d'energies "baix cap a dalt". Pressa de dades de la primera fase (energia i recurrències).
    - iv. Registres basals i mesures.
    - v. Inducció de fibril·lació ventricular mitjançant estimulació ventricular
    - vi. Desfibril·lació en fase prolongada (segona desfibril·lació) seguint el mètode de "baix cap a dalt". Pressa de dades de la segona fase (recurrències).
    - vii. Registres basals i mesures finals.
4. Processat de senyals electrogràfics (algorismes, anàlisi i extracció de resultats) (1-2 mesos).

5. Anàlisi dels resultats (2 a 3 setmanes):
  - a. Diferències entre els cors procedents del grup control i entrenat en funció de l'energia necessària per a desfibrillar-los en la primera fase (primera fibril·lació induïda).
  - b. El percentatge de la recurrència o reinstauració espontània total (primera i segona desfibril·lació) de la fibril·lació ventricular.
  - c. Paràmetres procedents del processat digital del senyal fibril·latori.
  
6. Redacció de la memòria i documentació de l'estudi (1 a 2 mesos)
  
7. Conclusions, discussió i defensa



## **2. MATERIAL I MÈTODES**

## 2 MATERIAL I MÈTODES

El present capítol conté la descripció detallada dels materials, instruments, tècniques i mètodes utilitzats per a l'obtenció dels resultats.

En primer lloc, es descriuen els materials i dispositius emprats per a dur a terme tant la fase d'entrenament, com l'experimental i el posterior processat de les dades resultades en aquesta. És en aquest apartat on es ressalten les característiques principals de la instrumentació utilitzada en el laboratori de fisiologia (Departament de Fisiologia de la Universitat de València), en concret el desfibril·lador utilitzat en aquestes, així com del programari empleat per a l'adquisició, tractament i anàlisi de les dades.

A continuació s'hi descriuen els mètodes. S'hi exposen els mètodes aplicats per tal d'obtenir les mesures, càlculs i determinacions que ha calgut efectuar per a l'obtenció dels paràmetres. També es detalla el protocol d'entrenament dels animals, així com el posterior protocol de preparació i execució experimental. D'igual manera, en aquest apartat, s'hi descriu el mètode de perfusió utilitzat per a mantenir en plena activitat electrofisiològica el cor aïllat.

Per últim, s'expliquen les ferramentes estadístiques i es detalla la legislació aplicada.

## 2.1 Material

### 2.1.1 Animals d'experimentació

El present estudi ha estat realitzat sobre preparacions vàlides de cor aïllat i perfós de conills mascles, de raça Nova Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), alimentats ad libitum i amb un pes mitjà a l'inici del protocol d'entrenament o estabulació de  $2'5 \pm 0'4$  kg. Els animals foren subministrats pel Departament de Fisiogenètica de la Universitat Politècnica de València.

### 2.1.2 Reactius

Les preparacions de cor aïllat (fases d'heparinització, anestèsia i perfusió) han requerit de l'ús de reactius i compostos que a continuació es detallen:

- Tyrode o solució nutricional:

CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl i glucosa de Panreac® Química S.A.

- Anestèsia:

Ketamina (Ketolar®) de Parke-Davis.

- Heparinització:

Heparina sòdica al 5% de Rovi®.

Els reactius es van obtenir de les firmes: Sigma-Aldrich Química® (Espanya), Boehringer Mannheim® S.A. (Alemanya), Panreac®, Merck Biochemica® (Alemanya), Fisher Scientific Company® (USA), Pharmacia Biotech® (USA), Intergen Company® (USA).

### 2.1.3 Instrumentació

La instrumentació utilitzada fou molt diversa, comprenent des de estructures i bastides per al suport de la preparació experimental fins a equipament i maquinari electrònic desenvolupat en exclusiva per als assajos. A continuació se'n fa esment de la més important.

#### 2.1.3.1 Sistema d'entrenament

Per a dur a terme les sessions d'exercici físic fou necessari l'ús d'un sistema d'entrenament adequat a les característiques dels animals d'estudi, per la qual cosa s'utilitzà un tapis rodant (treadmill) de la marca comercial Panlab® S.L.

Aquest tapis rodant està format per una o diverses cintes rodants (en funció del número de carrils requerits), de mides 450x100 mm aproximades, de velocitat (fins a 150 cm/s) i pendent ajustable (-25° a 25°), el què permet la realització d'exercici forçat i proves de fatiga amb rosegadors.

La màquina disposa d'una unitat on s'hi pot controlar de la velocitat de la cinta, mostrant-hi dades mesurades per pantalla, i el subministre (duració i intensitat) de corrent de xoc (0 a 2 mA) a la xarxa, així com la comunicació amb PC (RS-232), per a la qual cosa disposa d'un programari propi (SeDaCom©).

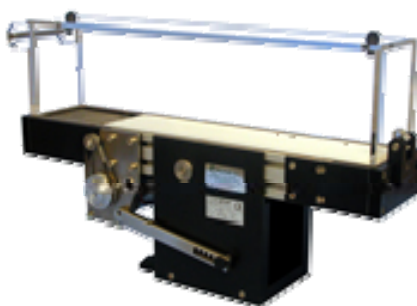


Figura 2. Sistema de tapis rodant de Panlab® S.L.

### 2.1.3.2 Sistema de perfusió

A l'hora de realitzar estudis sobre models de cor aïllat d'animals és necessari posar en pràctica un sistema que siga capaç de mantindre viu l'òrgan mentre les seues constants electrofisiològiques es mantenen estables i controlades (temperatura, pressió, concentració de nutrients i ions en la perfusió, oxigenació, etc.).

El sistema que reuneix aquestes condicions és el proposat per Oscar Langendorff en 1897.

El sistema de perfusió de Langendorff, desenvolupat sobre les bases establides per Elias Cyon (1866), té la particularitat de perfondre el cor de forma retrògrada, és a dir, via aòrtica, provocant el tancament d'aquesta. D'esta manera el líquid de perfusió passa a través de les artèries coronàries, irriga el miocardi i és drenat a l'exterior pel propi sistema venós cardíac. Atés que és la pròpia pressió de la perfusió la que tanca la vàlvula aòrtica permetent la irrigació coronària, el cor es manté constantment perfós amb independència que la seua activitat mecànica siga efectiva o no (Skrzypiec-Spring et al., 2007).

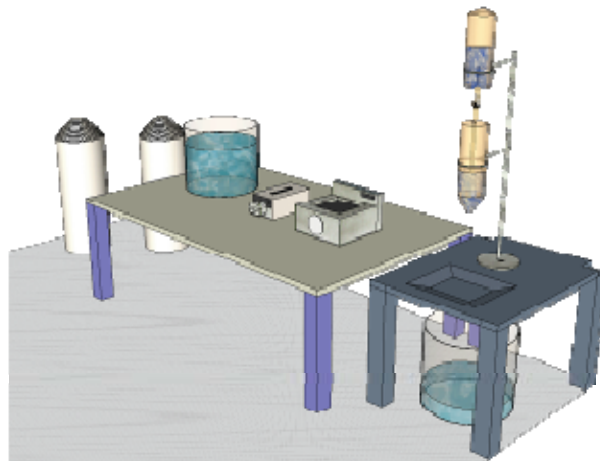


Figura 3. Croquis de disposició de la instrumentació d'un sistema de perfusió

Huí en dia, aquest és el sistema més utilitzat a causa de la seua efectivitat i la seua senzillesa, i el seu funcionament general ha romàs constant, incorporat únicament algunes millores relatives al control de temperatura, de pressió i d'oxigenació.



**Figura 4. Detall de la ubicació de la preparació per al model amb cor aïllat de conill**

En l'actualitat s'utilitzen líquids nutrics artificials (solució de Tyrode, solució de Krebs-Henseleit, etc) que s'oxigenen amb una mescla de O<sub>2</sub> (95%) i CO<sub>2</sub> (5%). Estos fluids contenen les proporcions adequades d'electròlits i glucosa i poden complementar-se amb albúmina o sang, especialment quan s'utilitzen cors d'espècies grans. La pressió de perfusió es manté constant (entre 60 i 80 mmHg), així com la temperatura (entre 36 i 37 °C) i el pH (entre 7,35 i 7,4) (Chorro FJ et al. 2009).

L'ocupació de cor aïllat en l'experimentació té algunes característiques fonamentals com que no depèn de l'efectivitat de l'activitat mecànica del cor, ni d'influències neurohumorals (sense innervació vegetativa).

El sistema, no obstant, té algunes limitacions i desavantatges com l'evidència d'un flux coronari més alt del normal (sense càrrega) i que la falta de proteïnes, ions naturals, hormones i altres molècules que es troben en la sang però no en el líquid nutrici utilitzat.

Tot i això és un sistema idoni per dur a terme estudis electrofisiològics com els que s'hi planteja en el present treball. Per tant, l'aplicació de la tècnica Langendorff, necessita principalment dels següents elements:

- Estructura de suport i sistema hidràulic metabòlic tipus Langendorff.
- Bomba peristàltica (Cole-Parmer® Instrument co.).
- Bomba recirculant de termostatació (Neslab® Instrument, inc).

En el següent esquema representa una preparació de cor aïllat de conill amb el sistema de perfusió Langendorff, en la que s'hi mostra la ubicació del

líquid nutricional (Tyrode) en un recipient airejat contínuament mitjançant una bala de carbogen (anhídrid carbònic al 5-10% i oxigen), un bany per a termostatitzar el líquid nutricional, les bombes de perfusió, un sistema de mesura de la pressió de perfusió, els filtres i els conductes i la càmera de perfusió per a la correcta conducció del Tyrode i del líquid termostatitzant (modificat de Tormos A, 2005).

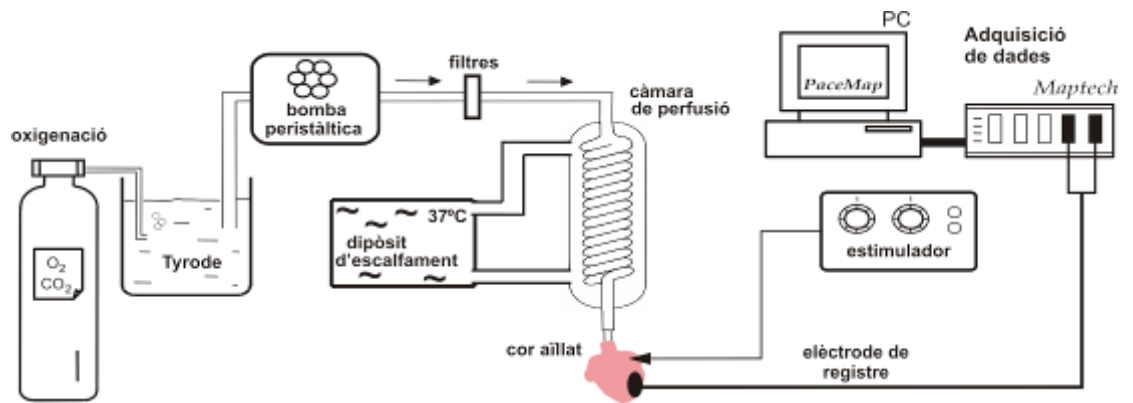


Figura 5. Esquema d'una preparació de cor aïllat de conill

### 2.1.3.3 Sistema d'estimulació i registre

Per últim, el sistema utilitzat per a dur a terme el protocol d'execució experimental està format per equipament d'estimulació i un sistema de registre.

#### Sistema d'estimulació:

Per a l'estimulació s'ha fet servir un estimulador Grass S88® (Grass Instruments®, Inc., Quincy, M.A., U.S.A.) proveït d'una unitat d'aïllament d'estímuls (Grass SIU5®). Aquest dispositiu permet emetre pulsos rectangulars de corrent podent-s'hi modificar paràmetres com ara la freqüència, la intensitat i la duració dels estímuls.

Tot i que l'estimulador disposa d'un xassís frontal on s'hi troben els comandaments per modificar aquests paràmetres, es disposa d'un sistema de control automàtic addicional, desenvolupat de manera exclusiva per a l'estimulador i que permet executar sessions programades o predefinides.

Per a dur a terme, en última instància, l'estimulació elèctrica miocàrdica es fan servir elèctrodes bipolars d'acer inoxidable amb un diàmetre de 0,125 mm, i una distància entre elèctrodes d'1 mm.



Figura 6. Estimulador GRASS S88 (vista frontal i detall)



### Sistema de registre:

Els senyals corresponents als electrogrames unipolars epicàrdics van ser adquirits i digitalitzats mitjançant un sistema de cartografia de l'activitat elèctrica epicàrdica anomenat Maptech® (Waalre, Holanda).

Amb aquest equipament, els electrogrames van ser amplificats, es van filtrar, eliminant les freqüències situades fora de la banda compresa entre 1-400 Hz, i es multiplexaren. La freqüència de mostratge en cada canal (un total de 256 canals amb guany 50-300) va ser d'1kHz, amb una resolució de 12 bits. Els registres obtinguts al llarg de l'experiment van ser emmagatzemats en suport digital per a la seva anàlisi posterior.

El sistema de registre el completen els propis elèctrodes de registre: un, de tipus bipolar, confeccionat amb plata (Ag-AgCl) i recobriment aïllant de Tefló®, de diàmetre total 0,5 mm per al registre de l'activitat auricular (auriculograma); i l'altre, un elèctrode múltiple per a registre dels electrogrames ventriculars, que comprén 240 elèctrodes unipolars d'acer inoxidable, d'un diàmetre 0,125 mm, ambdós amb una distància entre elèctrodes d'1 mm. A més, es fa ús d'un últim elèctrode, usat a mode de referència, en forma de placa de 4x6 mm i acabament en pinça, amb contacte directe sobre l'artèria aorta i la cànula de subjecció i connexió del cor al sistema Langendorff.



**Figura 7. Sistema MapTech (A), Multielèctrode 16x16 unipolars (B) , Disposició de registre sobre epicardi (C)**

#### 2.1.3.4 Sistema desfibril·lador

Com ja sabem la desfibril·lació, com a procés, suposa la suspensió i reversió del fenomen de fibril·lació, mitjançant la despolarització de totes o gran part de les fibres miocardiàques, per tal de permetre al cor el retorn al automatisme cardíac natural.

Els desfibril·ladors comercialment disponibles, proporcionen energies mínimes molt superiors a la del llindar desfibril·ladori, ja siga en la seva versió com a desfibril·lador extern (energies extremadament elevades per al cas que ens ocupa) com per al desfibril·lador implantable.

Llavors per a dur a terme els experiments en què es basa l'estudi fou necessari disposar d'un equip desfibril·lador que s'adaptara als requeriments de la preparació experimental del model amb cor aïllat de conill.

Aquest equip fou dissenyat *ad hoc* pel grup d'investigació Bio-ITACA de la Universitat Politècnica de València i per tant, donat que no es tracta d'un equip comercial, tot seguit es descriuran les seues característiques amb major detall que la resta de sistemes.

El desfibril·lador desenvolupat per a aquesta sèrie d'experiments té com a característiques principals:

- Capacitat de subministrament de xocs de baixa energia ( $E$ ): 0.05J - 2.99J
- Capacitat incremental d'energia mínima: 0.01 J
- Forma d'ona de xoc seleccionable: monofàsica, bifàsica o bifàsica polsada
- Càlcul de la duració efectiva del xoc aplicat ( $T_p$ ) i estimació de la resistència de la càrrega ( $R$ ).
- Protecció contra descàrrega amb càrrega en circuit obert.
- Connexió a xarxa com a alimentació i protecció contra possibles sobretensions.
- Interfície d'interacció amb pantalla LCD i botonera.

- Xassís aïllat i cablejat amb superfície adaptada per a l'aplicació de xocs.



**Figura 8. Frontal de l'interfície de l'equip desfibril·lador**



**Figura 9. Circuiteria interna del desfibril·lador**

El desfibril·lador és doncs un instrument electrònic d'ús mèdic, dissenyat per proporcionar una descàrrega elèctrica (xoc o *shock* en la variant anglesa) capaç de revertir un estat de fibril·lació (en el nostre cas ventricular) i aconseguir que el cor recupere un ritme normal (ritme sinusal) compatible amb les exigències de les funcions vitals.

És aquesta descàrrega elèctrica el que diferencia el nostre desfibril·lador, ja que, com s'ha dit en anterioritat, ha d'adaptar-se a les exigències de càrrega i forma d'ona de les nostres preparacions experimentals.

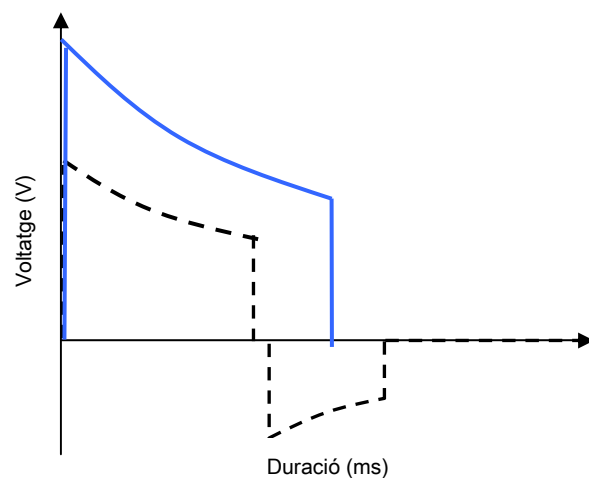
Assumint que la càrrega amb que es trobarà el desfibril·lador variarà amb poca significació d'un subjecte a un altre (en conills pot resultar

admissible un valor promig de 50  $\Omega$ ), serà doncs la forma d'ona la que ens resultarà d'interés, així com el paràmetre de selecció, que serà l'energia total del pols mesurada en Joules<sup>1</sup>, segons l'expressió:

$$E = \int_0^t \frac{V^2}{R} \cdot dt$$

El desfibril·lador amb forma d'ona exponencial decreixent truncada monofàsica (o monofàsica), l'estàndard durant els 40 últims anys, proporciona una descàrrega amb un flux de corrent en una sola direcció (d'un elèctrode o pala a l'altre). Els desfibril·ladors amb forma d'ona exponencial decreixent truncada bifàsica (o bifàsica) incorporen un flux de corrent en dues direccions, en el qual el corrent elèctric primer flueix en una direcció per després revertir en la direcció contrària (Lin et al., 1997, Matula et al., 1997, Walcott et al., 1998).

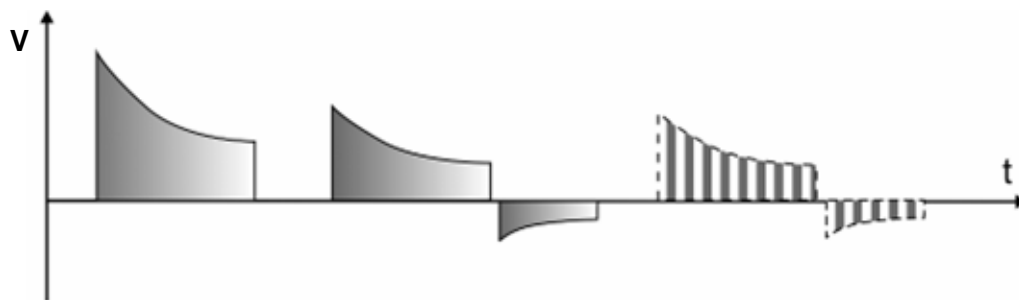
En el gràfic, l'eix vertical mesura el nivell de tensió i l'eix horitzontal indica la durada de la forma d'ona o el període de temps durant el qual el corrent flueix a través de la càrrega



**Figura 10. Forma d'ona Monofàsica (blau) i Bifàsica i nivells relatius**

L'aparell desenvolupat pel grup d'investigació permet la selecció de qualsevol d'aquestes dos formes d'ona, més una tercera, variant de la modalitat bifàsica, que afegeix a aquesta última una millora en quan al consum energètic efectiu.

<sup>1</sup> S'ha usat com a paràmetre seleccionable de referència l'energia (J), ja que és el més utilitzat entre els aparells desfibril·ladors comercials en l'actual pràctica clínica.



**Figura 11. Formes d'ona basades en l'exponencial truncada (Monofàsica, Bifàsica i Bifàsica pulsàtil)**

El principal avantatge que presenta la forma d'ona bifàsica respecte a la monofàsica és que el pic de corrent que es requereix per a la desfibril·lació amb èxit s'estima que és un 40% menor en el primer cas. Atés doncs, que les ones bifàsiques tenen pics de corrent més baixos que les monofàsiques, el risc de dany cel·lular miocardiàc és menor en la desfibril·lació bifàsica que en la monofàsica, a qualsevol nivell d'energia donat (Hwang et al., 2008; Kroll et al. 2007).

Una àmplia informació procedent d'estudis amb animals i humans, demostra que l'ús d'una forma d'ona bifàsica requereix menys energia per desfibril·lar i ofereix un major marge de seguretat front al d'una forma d'ona monofàsica (Rho et al., 2003).

Reprenent l'aparell desenvolupat, roman dir que se'n fa ús d'ell per als experiments de l'estudi amb una resolució de 0,01J d'energia i ens permet aplicar descàrregues d'ones bifàsiques (100 volts pic i inversió de polaritat en el 80% del cicle) amb l'energia ajustable entre 0,05J i 2,99J.

El funcionament electrònic es basa en dos fases corresponents a la càrrega i descàrrega del condensador. El control de l'energia de xoc transferida és realitzat automàticament per mitjà d'un microcontrolador que ajusta el temps de descàrrega del condensador, governant amb aquest objectiu els interruptors de flux de corrent positiu i negatiu segons l'esquema que es mostra a continuació.

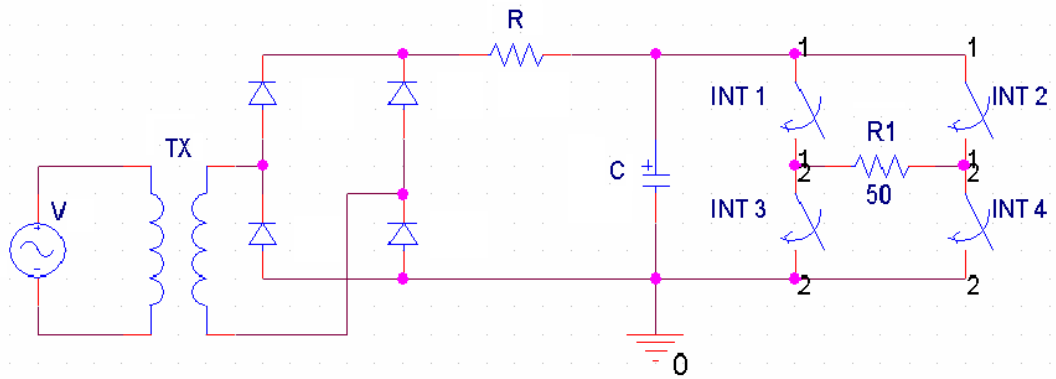


Figura 12. Esquemàtic del principi de funcionament electrònic del desfibril·lador

Els paràmetres seleccionables (regulables), en funció del tipus d'ona de xoc desitjada, es mostren a continuació referenciats en les següents figures:

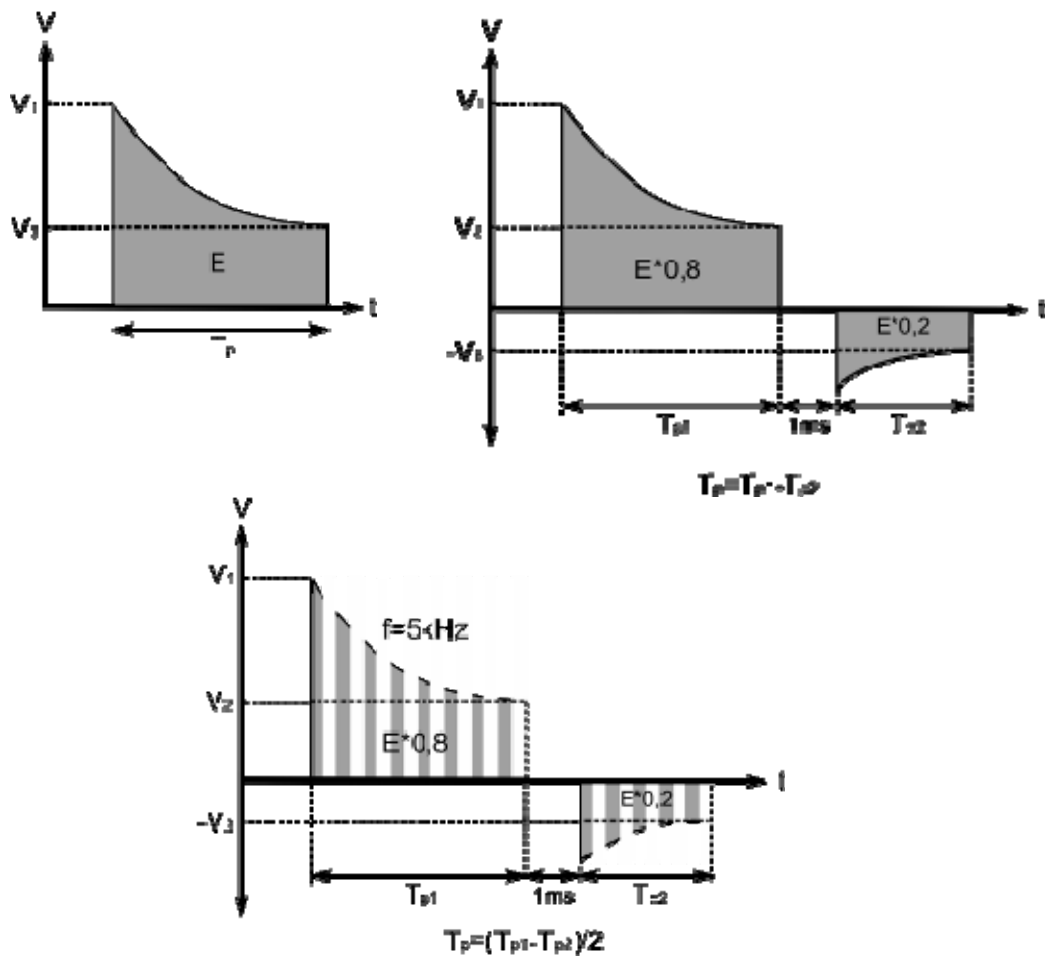


Figura 13. Paràmetres dels diferents tipus d'ona seleccionable

La nomenclatura correspon a:

- $E$  Energia subministrada (seleccionable).
- $V_1$  Tensió inicial del condensador (seleccionable, lligada a l'energia subministrable).
- $V_2$  Tensió d'inversió de fase del condensador (es calcula per a proporcionar un 80% de l'energia en la fase positiva).
- $V_3$  Tensió final del condensador.
- $T_p$  Duracions efectives del pols aplicat.

#### 2.1.4 Programari

En la fase d'adquisició dels senyals elèctrics durant els experiments, es van utilitzar fonamentalment dos entorns de treball.

D'una banda, el programari incorporat en el sistema d'adquisició Maptech® (Waalre, Holland), que rep el nom de PaceMap©. D'altra, el entorn de treball Matlab© (The MathWorks®, Inc., Natick, MA) amb un programari propi, desenvolupat i adaptat a mesura que van ser sorgint les necessitats en el transcurs de la fase de processat.

PaceMap© disposa de ferramentes addicionals pròpies per al processat automatitzat dels senyals, així com eines basades en la codificació de colors i l'animació per finestres, que poden aportar informació referent a línies isòcrones, distribucions d'interval VV i d'altres que no hem fet servir en el present treball.

En aquest aspecte, el del processat, l'entorn emprat ha estat MatLab©, reservant-se PaceMap© sols per a les tasques de registre i emmagatzematge. En aquest treball, qualsevol algorisme per al processat dels registres de senyals elèctrics ha estat desenvolupat i programat baix entorn MatLab©, de manera que s'han desenvolupat eines directa o indirectament relacionades amb el treball que ací es presenta (sols unes poques s'han fet servir) i que són indispensables en l'estudi electrofisiològic amb cor aïllat de conill:

- Importador de senyals binaris des de format PaceMap© (arxius o directoris d'arxius)
- Representació gràfica del senyal en temps o en freqüència, i utilitats derivades
- Preprocessador bàsic: en finestrat de la banda d'interés, filtratge de la component continua i línia base, ...
- Eliminador de *glitches* i espícules provinents de fonts sorolloses
- Automatització del càlcul de paràmetres electrofisiològics primaris, en funció del tipus de registre (ritme sinusal, test d'extra-estímul, fibril·lació ventricular, ...) com: períodes refractaris (funcional i efectiu), freqüències dominants dels espectres



- Automatització del càlcul de paràmetres electrofisiològics secundaris o derivats com: distribucions i estadístics, anàlisi temps-freqüència, isòcrones i línies isofreqüencials, mapes electro-cartogràfics diversos, entropies, índexs d'heterogeneïtat, etc...

Per últim ressenyar la utilització del paquet SPSS© (IBM®Co., Chicago, Illinois) per a l'anàlisi estadística dels resultats obtinguts; i dels paquets Open Office© (Netherlands) i Adobe Acrobat© (Adobe Systems® Inc., San Jose, CA) què han estat el suport ofimàtic del present treball.

## 2.2 Mètodes

### 2.2.1 Grups d'estudi

Per a l'estudi es distingí entre dos grups de conills: un grup control i un grup entrenat. El grup control, compost per un total de 8 conills no entrenats; i grup entrenat, compost per un total de 8 animals.

### 2.2.2 Protocol d'entrenament dels animals

El grup d'animals entrenats (grup entrenat) va ser sotmès a un protocol d'entrenament en cinta o tapís rodant (Such et al. 2008) durant 6 setmanes, més una addicional d'aclimatació, en total 7 setmanes.

El protocol d'entrenament va consistir en 30 sessions, durant 6 setmanes, repartides a raó de 5 sessions per setmana. Cadascuna d'aquestes sessions es va compondre de 6 sèries de 4 minuts de carrera contínua sobre tapís rodant, intercalant un minut de descans entre cadascuna de les sèries, en cadascuna de les quals l'animal va córrer a una velocitat de 0,33 m/s (1,2 km/h). Així, el temps d'entrenament diari total va ser de 30 minuts.

Prèviament a la iniciació de les sessions d'entrenament, els conills van ser sotmesos a un període de 3 a 5 sessions de familiarització amb la cinta rodant.

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

Els conills no entrenats (grup control) van romandre en les respectives gàbies (estabulats) durant un temps igual al total del temps necessari per a l'entrenament dels conills del grup entrenat.

Les condicions en què van romandre estabulats els conills també van ser controlades, seent el fotoperíode de llum artificial de 12 hores (12 hores de llum i 12 hores de foscor), la temperatura es va mantindre entre els 21-23°C i la humitat relativa al 31%. Cada conill va estar en una gàbia individual de dimensions reglamentàries amb les condicions d'higiene i neteja més adequades.

Es va alimentar tots els animals estudiats amb aigua i pinso *ad libitum*.

La programació de l'entrenament s'establí en funció de la necessitat d'individus per a l'estudi, de manera que el calendari d'entrenament s'adequava a la previsió de dates en que es realitzaria cada estudi (composat normalment per una jornada completa a la setmana, amb estudi d'un cas control i d'un cas entrenat).

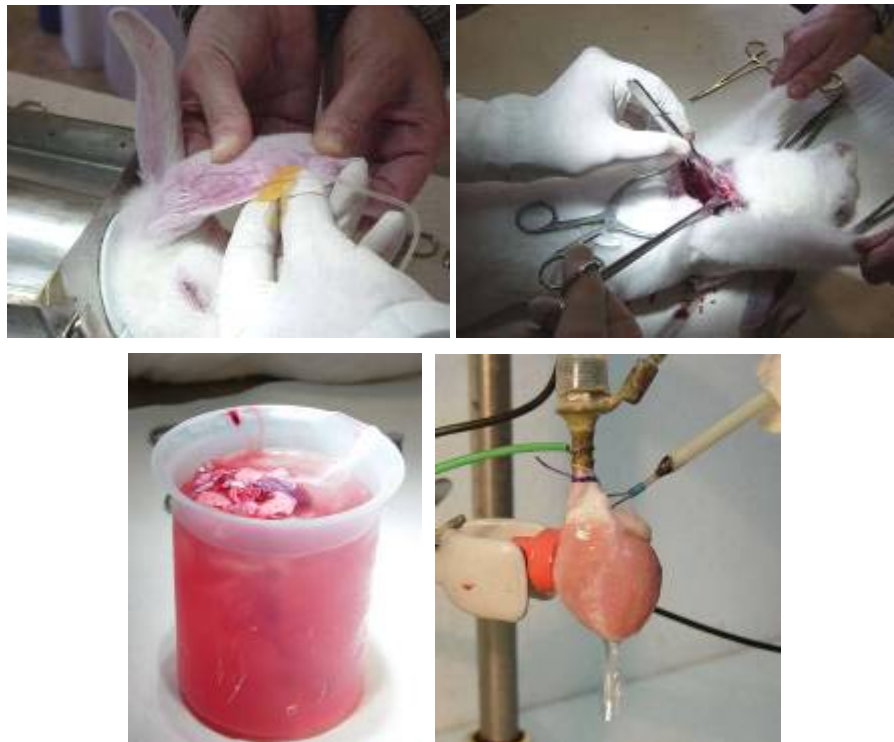
## 2.2.3 Estudi electrofisiològic

### 2.2.3.1 Preparació experimental

La preparació experimental de cadascun dels conills començà amb el trasllat del conill des de l'estabulari fins al laboratori d'electrofisiologia, on romanen durant poc menys d'un hora, aclimatant-se i aconseguint novament reprendre la situació normal prèvia al trasllat, reduint-ne l'estrès.

Quan els aparells eren apunt es procedí a la fase quirúrgica de la preparació experimental. Després de l'heparinització (heparina 800 u.i.), i l'anestèsia intravenosa a través de la vena marginal de l'orella (ketamina 12,5 mg/kg), els conills van ser sacrificats per mitjà de contusió cervical.

Posteriorment es realitzà una toracotomia mediosternal seguit d'una pericardiotomia, es va extraure el cor ràpidament, seccionant-lo pel seu pedicle vascular, i es va submergir en una solució freda de Tyrode (8 °C), per a la seua posterior manipulació.



**Figura 14. Distints instants de la preparació experimental**

D'esquerre a dreta i dalt cap a baix: Anestèsia amb ketamina (25 mg/kg) i heparinització; toracotomia i pericardiotomia per a posterior resecció del cor; immersió del cor en Tyrode fred (parada cardíaca per hipotèrmia); connexió del cor al sistema de perfusió Langendorff.

Després de seccionar l'artèria pulmonar, es dissecà l'artèria aorta ascendent i es va seccionar, connectant-la al sistema de Langendorff, on s'hi va fixar per mitjà d'un fil de seda de 1-2 mm de diàmetre.

D'esta manera, aquest sistema de perfusió de Langendorff, permet l'arribada al cor de l'oxigen i els nutrients necessaris a través de l'aorta ascendent. Es tracta d'una perfusió retrògrada cap al sistema de vasos coronaris amb la solució de Tyrode a  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , el cor rep doncs, a través de l'artèria aorta ascendent i les coronàries, suficient solució nutritiva, irrigant el miocardi per complet, permetent-li seguir amb la seua activitat electrofisiològica de manera aïllada durant unes hores. El pH es va mantenir en tot moment a 7,4 (García Civera R et al., 1987).

L'oxigenació i suport de pH de la solució de Tyrode es va efectuar amb carbogen (95%  $\text{O}_2$  i 5%  $\text{CO}_2$ ). La pressió de perfusió inicial es va fixar en 60mmHg.

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

El líquid de perfusió és impulsat des d'un depòsit exterior (on és oxigenat) fins a la part més elevada del sistema de Langendorff per mitjà d'una bomba peristàltica, passant prèviament per un filtre. Una vegada en el sistema el líquid va escalfant-s'hi progressivament fins a aconseguir una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

Els elèctrodes es van disposar de la següent manera:

Es va ubicar un elèctrode bipolar, revestit de plata (Ag-AgCl), per al registre de l'electrògrama auricular en l'aurícula dreta (monitorització).

Així mateix, el registre ventricular es va realitzar per mitjà d'un elèctrode múltiple amb 240 elèctrodes unipolars (canals de registre) d'acer inoxidable col·locats en la superfície epicàrdica de la paret lateral del ventricle esquerre.

D'altra banda, un elèctrode bipolar d'estimulació es va col·locar en el ventricle esquerre per a la realització del test de l'extra-estímul ventricular (TEEV) i la inducció de l'FV per mitjà de l'estimulació a freqüències creixents.

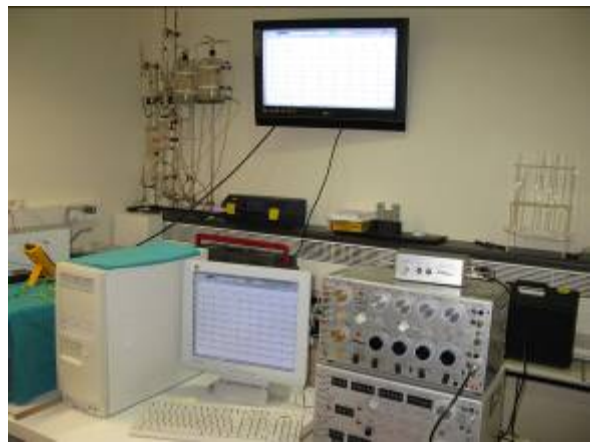
L'elèctrode de referència es va ubicar en contacte amb l'artèria aorta ja encanulada.

### 2.2.3.2 Protocol d'execució experimental

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

1. Mesura de flux coronari i registre electrogràfic basal.
2. Test de l'extra-estímul ventricular (TEEV) amb cicle d'estimulació al 10% de longitud de cicle basal (LCB), des de 200ms per a determinar llindars d'inducció i estudi de la refractarietat ventricular.
3. Inducció de fibril·lació ventricular (FV) programada a freqüències creixents (intensitat d'estimulació al 400% del llindar diastòlic), tres intents automàtics i, si es cau, nous intents en mode manual. Es va induir l'FV del miocardi estimulant el ventricle esquerre a freqüències creixents a partir de 4 Hz, amb un increment de 0,1Hz cada 3s fins a desencadenar l'FV mantenint la perfusió coronària. L'estimulació va ser interrompuda en el moment en què es va instaurar l'FV.
4. Fase 1: Determinació del llindar desfibril·latori (LD) a partir dels 15 primers segons d'FV. Paràmetres inicials configurats de voltatge màxim de càrrega en 100 V i energia inicial de 0.05J. El protocol és de tipus "baix cap a dalt" des de 0,05 J, en increments de 0,01 J, fins desfibril·lació. En cas de no ser aquesta desfibril·lació efectiva o reeixida (recuperació total d'estabilitat del cor a ritme sinusal), és a dir, si es produeix recurrència en l'FV després d'aconseguir desfibril·lar, es repeteix el xoc des de l'últim valor, fins un màxim de tres recurrències consecutives. En cas d'assolir aquest nombre de recurrències consecutives o d'adaptació a l'energia de xoc per part del cor, el protocol "baix cap a dalt" es reprèn seguint amb el següent valor immediat (increment d'energia en 0.01J).
5. Mesurar novament flux i realitzar registre electrogràfic basal.
6. Determinar novament llindars i mesurar refractarietat amb TEEV al 10% de la LCB, des de 200ms.
7. Segona inducció de l'FV a freqüències creixents (3 intents automàtics i, si escau, manual)

8. Fase 2: Determinació del LD a partir dels 180 segons d'FV, seguint idèntiques pautes del protocol abans esmentat. Especial importància a la quantificació de recurrències.
9. Última mesura de flux, realització de registre basal i mesura de la refractarietat amb TEEV al 10% de la LCB, des de 200ms.
10. Desmuntatge de la preparació i mesura del pes del cor



**Figura 15. Sistemes implicats en l'experiment: sistema de perfusió i sistema de registre/estimulació**



**Figura 16. Instant de la desfibril·lació i detall de l'aplicació sobre la preparació**



### *2.2.3.3 Definició i determinació dels paràmetres a investigar*

Tot seguit es descriuen els paràmetres que han estat objecte d'estudi en aquest treball, així com la metodologia, sense entrar en detall, d'obtenció d'aquests.

#### **Llindar desfibril·latori**

Entenem per llindar desfibril·latori o energia llindar desfibril·latòria (defibrillation threshold, DT en anglés) aquell llindar d'energia mínima necessària per a realitzar una cardioversió exitosa front a un episodi d'FV, aconseguint-se així el retorn estable al ritme sinusal (Chen et al. 1998).

Per tal d'obtindre aquest llindar o nivell d'energia mínima s'executa el protocol esmentat amb anterioritat, de tipus "baix cap a dalt", aplicant xocs elèctrics des d'una cota inicial de 0,05 J, augmentant l'última energia aplicada en increments de 0,01 J, fins que s'assoleix la desfibril·lació amb èxit (entenem que una desfibril·lació és exitosa si no recorreix, seguint paràmetre a determinar).

#### **Recurrència de la fibril·lació**

Entenem per recurrència la no recuperació total d'estabilitat del cor a ritme sinusal immediatament posterior a l'aplicació del xoc desfibril·latori. Aquest fenomen pot donar-se de manera recurrent o repetitiva per a una mateixa energia d'aplicació o pot manifestar-se front a diversos nivells d'energia al llarg del protocol estipulat (en el nostre cas, anotarem un màxim de fins a tres repeticions en una mateixa energia per la pròpia definició del protocol experimental) (Chen et al. 1998).

La determinació de la quantitat d'episodis recorrents durant el protocol desfibril·latori es basa en l'anotació de les observacions dels successos recidiva (incapacitat recuperació total d'estabilitat del cor a ritme sinusal), és a dir, si es produeix o no recurrència en l'FV després d'aconseguir desfibril·lar. D'esta manera, tot i que es quantificaren la quantitat de recurrències per a una mateixa fase, l'anotació fou qualitativa (conill recidiu o no), tenint en consideració ambdues fases del protocol.

### **Entropia del senyal**

Definim l'entropia com aquell estimador que ens mostra una valoració de l'organització o la regularitat de les dades d'un senyal, donant una idea de com de repetitiu o caòtic pot ser un sistema o procés i aportant informació predictiva d'aquests que, aparentment, són definits com estocàstics (Pincus et al., 1994).

L'obtenció d'aquest paràmetre es fa a partir del càlcul de l'índex d'entropia mostral, que es descriu en detall en l'apartat metodològic corresponent, usant com a paràmetres d'estimació un número mostral  $m=2$  i una tolerància de versemblança fixada en  $r=0.25$ .

### **Freqüència dominant i Concentració espectral**

Entenem per freqüència dominant (FrD o DF en la variant anglesa) de l'FV, la freqüència amb què la distribució espectral de potència del senyal presenta la màxima amplitud (Ropella, 2001; citat per Tormos, 2005). Així en el present treball estudiarem la freqüència dominant mitja que és la mitjana de les freqüències dominants registrades pel multielèctrode en un temps determinat de l'FV.

De la mateixa manera, al contingut en potència dins d'un en finestrat al voltant de l'FrD es coneix com concentració espectral de la freqüència dominant (CoE).

La freqüència dominant mitjana dels senyals fibril·latoris s'obté per mitjà de l'estimació de la densitat espectral de potència del senyal, fent ús del mètode de Welch que es detalla més endavant. Aquesta anàlisi es va efectuar utilitzant blocs de dades de 2048 punts, aplicant la finestra d'Hamming. Es va obtenir per a cada bloc la freqüència dominant (FrD), és a dir, la freqüència corresponent amb l'espectre màxim, i la concentració espectral o energia continguda en el segment del periodograma corresponent a  $FrD \pm 1$  Hz.

## 2.2.4 Processat digital del senyal

A continuació es detallen les tècniques de processat digital del senyal que han estat utilitzades per caracteritzar el episodis experimentals de fibril·lació ventricular.

Primer farem una breu descripció de les característiques del conjunt de registres de dades que s'obtenen mitjançant els sistemes descrits amb anterioritat, més avant descriurem les tècniques de processat utilitzades per a l'obtenció dels paràmetres baix estudi fixats als nostres objectius. D'aquestes tècniques s'han escollit dos representatives, l'índex d'entropia mostral (domini temporal del senyal) i el càlcul de la freqüència dominant (domini freqüencial), d'ús justificat als antecedents del present treball.

### 2.2.4.1 Base de dades

L'expressió mínima, a nivell de membrana cel·lular, de l'activitat elèctrica biològica és el que es coneix com potencial d'acció. Aquesta expressió, en models biològics, sols és enregistrable mitjançant l'ús de tècniques que inclouen la utilització de material de laboratori de dimensions molt reduïdes (de l'ordre de les micres) i requereixen preparacions amb cèl·lules aïllades.

Aquestes tècniques resulten de vital importància a l'hora de caracteritzar el comportament dels canals iònics i les propietats relatives a nivell cel·lular, però aporten poca informació respecte a l'activitat del teixit.

D'esta manera l'avaluació de l'activitat elèctrica del cor en models experimentals com el del present estudi es basa sobretot en l'anàlisi dels senyals enregistrats en superfície epicàrdica (contribució de l'activitat de tot o part del teixit), ja siga auricular o ventricular (tot i que se'n fan tant intercavitàries com transmural). Aquests senyals, coneguts com electrogrames o EGM, són una eina fonamental per a l'estudi dels desordres elèctrics del cor.

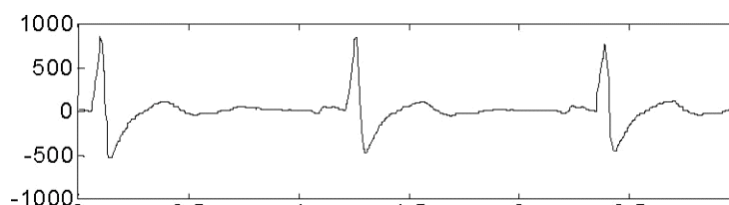


Figura 17. EGM durant ritme sinusal

El registre d'EKG consisteix a captar el camp elèctric per mitjà d'un o més conductors situats en estret contacte sobre el teixit cardíac. Hi ha dos variants, en funció del tipus de mesura.

### **EKG Unipolar**

L'EKG unipolar es realitza amb un sol elèctrode connectat al terminal positiu de l'amplificador mentre el terminal negatiu es connecta generalment a un punt de tensions comunes que es considera la terra del sistema. En l'EKG unipolar contribueixen dos camps elèctrics: el camp elèctric pròxim i el camp elèctric llunyà <sup>2</sup>.

### **EKG Bipolar**

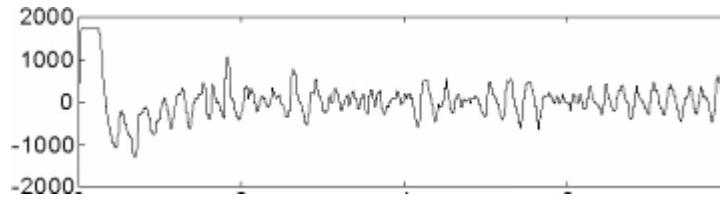
L'EKG bipolar es realitza amb dos elèctrodes molt pròxims entre si, en contacte directe amb el miocardi, connectant un al terminal positiu de l'amplificador diferencial i l'altre al negatiu, i per tant podria dir-se que correspon amb la diferència de dos EKG unipolars molt pròxims.

En aquest cas també es té la contribució del camp pròxim i del camp llunyà. No obstant això, el segon és menys rellevant atès que el camp llunyà captat per ambdós elèctrodes és molt semblant i pràcticament s'anul·la al realitzar la diferència.

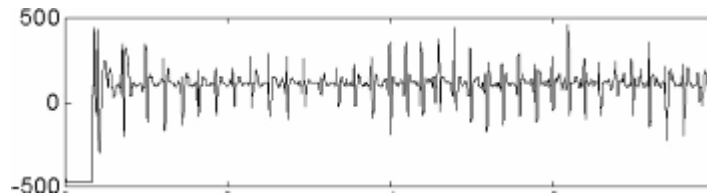
L'amplitud del senyal registrat amb este mètode està íntimament lligada a l'angle del front d'onda respecte de la línia que formen el parell d'elèctrodes, sent major com més perpendicular siga la línia del front d'onda respecte dels elèctrodes. Este fet constitueix la seua major virtut i al mateix temps el seu major inconvenient, ja que són molt útils per a estudis de velocitat i direcció de propagació però molt poc útils quan l'activació és caòtica com en els estudis de la fibril·lació ventricular, on la direcció dels fronts d'onda canvia constantment.

---

<sup>2</sup> El camp elèctric pròxim es generat per les cèl·lules que es troben en contacte amb l'elèctrode; en canvi, el camp elèctric llunyà es generat per les cèl·lules distants i contribueix de manera inversament proporcional a la distància a què es troben de l'elèctrode.



**Figura 18. Electrograma unipolar**

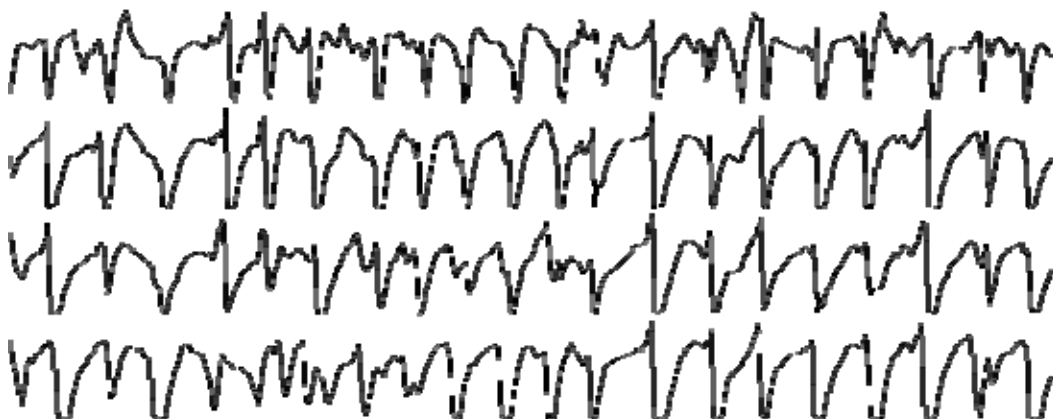


**Figura 19. Electrograma bipolar**

En el present treball, s'ha fet ús d'aquestos registres o electrogrames a partir de la forma de la seua adquisició unipolar.

El nostre sistema de registre, com ja s'ha esmentat en anteriors apartats, es basat en l'adquisició d'un mapa elèctric conformat per l'aportació d'informació d'uns centenars de canals (240) i que es coneix pel nom de mapeig elèctric (Konings et al. 1997).

Per tant la nostra base de dades inicial serà, per a les diferents fases establertes en el protocol d'execució experimental de cadascuna de les preparacions amb cor aïllat de conill, un arxiu amb informació de cadascun dels canals amb el contingut de totes les mostres simultàniament obteses; o el que ve a ser el mateix, un arxiu amb tants EGMs com canals dispose l'elèctrode.



**Figura 20. Registre on s'hi mostren fins a quatre canals i els respectius EGMs**

#### 2.2.4.2 Estimació de l'entropia mostral

Els patrons de l'activitat elèctrica miocàrdica durant la fibril·lació s'han considerat sovint com un fenomen aleatori. No obstant això, el fet que els espectres dels electrogrames obtinguts durant fibril·lació exhibeixin freqüències principals ben diferenciades suggereix que el procés no és completament aleatori, sinó que ha d'existir algun tipus d'organització com alguns autors proposen (Pincus et al., 1994).

Com ja s'ha comentat en anteriors apartats, les mesures d'entropia s'han començat a utilitzar recentment per analitzar la complexitat de sèries temporals fisiològiques i en particular per quantificar la irregularitat de l'activitat elèctrica de teixits cardíacs.

En aquest estudi s'utilitza l'entropia mostral (Richman et al., 2000) per mesurar la complexitat dels senyals, en concret, com més gran és l'entropia més gran és el contingut aleatori del senyal (soroll o caos) i, per tant, menor el grau d'organització.

D'esta manera, i tal i com ho definiren Richman i Moorman (2000), el desenvolupament del càlculs parteix de la consideració formal de que un senyal discret ve donat per un número  $N$  de sèries de mostres o dades, i per al nostre cas, en el temps (series temporals).

$$\{x(n)\} = x(1), x(2), \dots, x(N)$$

Partint d'aquest número  $N$  de sèries temporals definim un vector finit de tamany  $m$  que agrupe una successió de sèries del nostre interès.

$$v_m(1), v_m(2), \dots, v_m(N-m+1) \quad \text{seent} \quad \begin{cases} v_m(i) = \{x(i), x(i+1), \dots, x(i+m-1)\} \\ 1 \leq i \leq N-m+1 \end{cases}$$

A continuació es defineixen les distàncies entre vectors  $v_m(i)$  i  $v_m(j)$  com  $dv_m(i,j)$  seent aquesta la màxima diferència absoluta entre les seues components escalars:

$$dv_m(i, j) = \text{MAX}_{k=0,1,\dots,m} \{x(i+k) - x(j+k)\}$$

Donat un parell de vectors  $v_m(i)$  i  $v_m(j)$ , es computa el número d'índexs  $j$  ( $1 \leq j \leq N-m$ ,  $j \neq i$ ) per als quals la distància  $dv_m(i,j)$  és inferior o igual a un

valor de tolerància  $r$ , nomenant-ho com  $n_m^i$  lligat a aquesta tolerància. El valor resultant serà  $C_m^i$  lligat a aquesta tolerància.

$$C_i^m(r) = \frac{n_i^m(r)}{(N - (m - 1))}$$

Si estenem aquesta consideració per a tots els elements, tindrem  $U^m(r)$ :

$$U^m(r) = \frac{1}{N - m} \sum_{i=1}^{N-m} C_i^m(r)$$

I si sobre aquest, incrementem la dimensió a un tamany  $m+1$ , tindrem  $U^{m+1}(r)$ :

$$U^{m+1}(r) = \frac{1}{N - m + 1} \sum_{i=1}^{N-m+1} C_i^{m+1}(r)$$

Així doncs, tindrem que  $U^m(r)$  és la probabilitat de que dos seqüències coincidisquen  $m$  punts i  $U^{m+1}(r)$  que ho facen  $m+1$  punts.

Si atenem a la definició de l'entropia mostral (*SampEn*) de Richman i Moorman (2000), descrita com el negatiu del logaritme natural d'una estimació de la probabilitat condicional de subsèries d'una longitud  $m$  que coincideixen de forma consecutiva ( $m, m+1$ ) amb una tolerància  $r$ , tindrem que:

$$SampEn(m, r) = \lim_{N \rightarrow \infty} \left\{ -\ln \left( \frac{U^{m+1}(r)}{U^m(r)} \right) \right\}$$

amb estimador estadístic :

$$SampEn(m, r, N) = -\ln \left( \frac{U^{m+1}(r)}{U^m(r)} \right)$$

Obtenim doncs, l'expressió de l'entropia mostral (*SampEn*) en funció de tres paràmetres:  $N$  essent un nombre finit, i els valors  $m$  i  $r$ .

Malgrat que  $m$  i  $r$  són fonamentals per determinar el resultat de l'entropia mostral, no hi ha guies per a l'optimització dels seus valors.

En principi, la precisió i la confiança de l'estimació de l'entropia millora a mesura que augmenta la quantitat de coincidències. Aquesta quantitat de coincidències es pot augmentar mitjançant l'elecció de sèries amb  $m$  menudes i  $r$  grans. Per evitar una contribució significativa del soroll en el

càlcul de la *SampEn*, s'ha de triar una tolerància  $r$  més gran que la majoria dels sorolls (Pincus et al., 1991).

Aquesta funció, *SampEn*, ha estat programada com algorisme amb el programari MatLab©.

Inicialment s'han carregat els arxius de registre de fibril·lació dels experiments, amb els què s'ha treballat canal per canal (240 en total), primer delmant el senyal individual, i calculant-ne la desviació estàndard.

Aquesta desviació estàndard és utilitzada, junt amb un factor d'escala de valor comprés entre 0.1 i 0.25, per estimar la tolerància  $r$ , tal i com fou proposat per Pincus i com ja hem justificat amb anterioritat (Pincus et al., 2001). Pel que fa al paràmetre  $m$ , els valors més àmpliament establerts són  $m=1$ ,  $m=2$  o fins i tot  $m=3$  (Shin et al., 2006; Al-Angari et al., 2007; Cervigón, 2009; Chesnokov et al., 2008; i Platisa et al., 2008).

Els valors triats per al present treball han estat  $m=2$  i  $r=0.15$  per ser valors centrals.



### 2.2.4.3 Càlcul de la freqüència dominant i la seua concentració espectral

A continuació es descriuen les tècniques aplicades per al càlcul dels paràmetres del domini freqüencial baix estudi. Primer abordarem el càlcul de l'espectre en freqüència i l'elecció de l'estimador més adient; a continuació descriurem la metodologia per a l'obtenció de la freqüència dominant i la seua concentració espectral.

#### 2.2.4.3.1 Obtenció de la densitat espectral de potència

L'espectre d'energia d'un senyal representa les dades d'aquest, que vénen expressades en forma de sèries temporals, com a l'energia continguda en les diferents freqüències en una regió o banda mostrejada de les dades. A aquest espectre se'l denomina densitat espectral d'energia o densitat espectral de potència (DEP) (Oppenheim i Schafer, 1975).

Un problema molt comú i amb grans aplicacions pràctiques en processat de senyal és el d'estimar<sup>3</sup> aquesta densitat espectral de potència d'un senyal EGM, fent possible la identificació de periodicitats amagades en aquests tipus de funcions de variable discreta (mostrejada).

Les tècniques d'estimació es divideixen en dos grans grups:

- **Paramètriques:** Consistents en la suposició d'un determinat model per al procés estocàstic (models AR, MA, ARMA, etc...) i en l'estimació dels paràmetres d'aquests models mitjançant tècniques de predicció lineal o altres mètodes.
- **No paramètriques:** Basades en el càlcul del periodograma, que suposa el càlcul de la transformada de Fourier (TF en la versió contínua de les dades o DFT en la versió discreta) d'un registre de senyal per estimar el seu espectre.

Per a obtindre aquest espectre d'energia, computacionalment és necessari aplicar la versió eficient<sup>4</sup> de la transformada discreta de Fourier (DFT), açò

---

<sup>3</sup> Diguem "estimar" ja que, com el senyal és un procés estocàstic, no és possible determinar amb absoluta precisió la seva DEP llevat que disposem d'un registre de senyal infinit, la qual cosa no és possible.

<sup>4</sup> L'avaluació directa de la DFT requereix  $N^2$  operacions de càlcul front a les  $N \cdot \log_2(N)$  requerides per al càlcul de l'FFT, més ràpida front a una major resolució.

és el que es coneix com la transformació ràpida de Fourier (FFT) que fou descrita per primera vegada per Cooley i Tukey en 1964. Aquesta versió de la transformada en freqüència és més ràpida tot i que pot resultar ineficient si el que es desitja és una gran resolució en valors.

Basat en aquest tipus de transformada discreta tenim al nostre abast diverses eines, entre elles el que es coneix com l'estimador periodograma (*sample spectrum*), introduït per Schuster en 1898.

El periodograma té com a avantatge la senzillesa de càlcul, però la seva precisió en l'estimació de l'espectre és molt limitada, especialment per a conjunts reduïts de dades (Proakis i Manolakis, 1996). Aquest mètode<sup>5</sup> estima la potència espectral a partir del càlcul de la transformada de Fourier i s'expressa de la següent manera:

$$\hat{S}_x(e^{j\omega}) = \frac{1}{N} X_N(e^{j\omega}) X_N^*(e^{j\omega}) = \frac{1}{N} |X_N(e^{j\omega})|^2$$

On és necessari descriure un tipus d'enfinestrat (o finestra) per a l'operació implícita d'autocorrelació. Aquesta finestra proporciona un compromís entre la resolució (amplada del lòbul principal) i l'emascament<sup>3</sup> espectral (amplitud de lòbuls laterals). D'esta manera, per a millorar el comportament esbiaixat del periodograma i l'emascament, és desitjable l'ús de finestres estretes en el domini de la freqüència, però açò condueix irremediament a periodogrames amb una gran variància.

Aquells periodogrames amb finestres distintes a la rectangular se'n diu que són periodogrames modificats, encara que hi ha modificacions aplicades al periodograma, no relacionades amb l'enfinestrat, que aconsegueixen millorar les seves prestacions.

Seguint aquest plantejament de millora de prestacions apareix el mètode de Bartlett (1948) és un estimador consistent (reducció del biaix) de l'espectre de potència, que realitza una mitjana del periodograma. La millora respecte al periodograma resideix en la reducció de variància.

Arrel d'aquest últim, P.D. Welch, en 1967, va proposar dues modificacions al mètode de Bartlett: va permetre el solapament de segments de dades (*overlap*) i proposà l'enfinestrat de cada seqüència  $x_i(n)$  amb una

---

<sup>5</sup> El desenvolupament matemàtic i la problemàtica d'emascament del periodograma es pot consultar als annexes.

finestra general  $w(n)$  (no només amb la finestra rectangular), abans de calcular el periodograma. D'aquesta manera s'obté un periodograma modificat per cada seqüència enfinestrat.

$$\hat{S}_w(e^{jw}) = \frac{1}{KLU} \sum_{i=0}^{K-1} \left| \sum_{n=0}^{L-1} w(n)x(n+iD)e^{-jnw} \right|^2$$

D'esta manera, el mètode de Welch, metodològicament requerirà de dos processos afegits al mètode bàsic d'estimació del periodograma i de la modificació de Bartlett, que descrivim a continuació :

1. El senyal es divideix en segments superposats: El segment de dades original es divideix en segments de dades L de longitud M, solapant un número D de mostres.
  - i. Si  $D = M / 2$ , el solapament es diu que és del 50%
  - ii. Si  $D = 0$ , la coincidència es diu que és del 0%. Aquesta és la mateixa situació que en el mètode de Bartlett.
2. Els segments que es superposen a continuació són enfinestrats: Després de que el registre de dades es divideix en segments superposats, s'aplica una finestra als segments individuals L.
  - i. La majoria de finestres exerceixen una major influència en les mostres centrals que en les laterals o de les vores, el que representa una pèrdua d'informació. Per mitigar aquesta pèrdua, els conjunts de dades individuals són freqüentment superposats en el temps (com en el pas anterior).
  - ii. Precisament, aquest enfinestrat dels segments és el que fa que del mètode de Welch periodograma modificat.

Després d'aquests passos previs, el periodograma es calcula mitjançant el càlcul de la transformada discreta de Fourier (DFT), per calcular, a continuació, la magnitud al quadrat del resultat, com hem vist expressat un poc abans. Amb aquests "periodogrames individuals", finalment es farà la mitjana pel temps, el que redueix la variància del càlcul de la potencia individual (Welch, 1967).

L'estimador periodograma mitjançant el mètode Welch es troba com a funció ja programada en llenguatge utilitzat en MatLab©, i té el següent descriptor:

$$[P_{xx},f] = pwelch(x,window,noverlap,nfft,fs)$$

Les variables d'entrada de la funció i els valors utilitzats seran:

VARIABLE	DESCRIPCIÓ	VALOR
$x$	el senyal en format vectorial	canal ##
$window$	longitud d'enfinestrat	2048
$noverlap$	el número de mostres d' <i>overlap</i> desitjades	1024
$nfft$	la resolució amb què volem fer la FFT	2048
$fs$	la freqüència de mostreig del senyal	1000

**Taula 2. Variables d'entrada de la funció "pwelch"**

La finestra usada en este treball en el càlcul del periodograma, i que ve predefinida amb el mètode Welch, és una finestra Hamming. La seua major virtut radica que manté un bon equilibri entre la seua duració temporal i la seua resolució en freqüència, tot i que aquesta finestra atenua el senyal en els extrems del mateix.

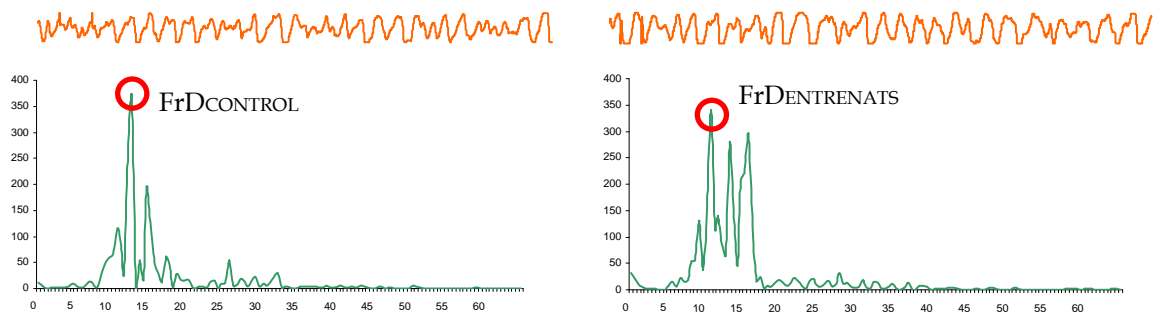
#### 2.2.4.3.2 *Obtenció de la freqüència dominant i la seua concentració espectral*

Establert el mètode per a l'obtenció de l'espectre en freqüència, definirem el paràmetre freqüència dominant (FrD o DF en la variant anglesa) com la freqüència a la qual l'espectre de potència de l'EGM és màxim.

Com a conseqüència de l'estructura harmònica de l'espectre de potència de l'EGM, l'FrD coincideix amb un dels harmònics espectrals, i per tant és un múltiple sencer de la freqüència fonamental.

L'anàlisi de l'FrD és usat per a detectar àrees d'EGMs d'alta freqüència durant episodis d'arítmies, per la qual cosa l'ús de l'anàlisi espectral dels EGMs registrats s'ha incrementat en els últims anys (Ryu,K. et al. 2006), ja que és de gran ajuda per a l'estudi i caracterització de les arítmies.

Per mitjà d'un mapeig és possible construir mapes d'FrD, mitjançant el traçat de la freqüència dominant en les distintes regions. Esta tècnica cartogràfica de freqüències dominants, basada en mètodes d'anàlisi espectral del senyal, va ser introduïda fa alguns anys per a quantificar la distribució espacial de les freqüències d'activació elèctrica tant en la fibril·lació ventricular com en l'auricular (Zaitsev et al., 2000).



**Figura 21.** Exemple de càlcul de la determinació de la freqüència dominant de l'FV

Com que l'objectiu no versa entorn a l'obtenció de mapes on s'hi delimiten regions de FrD i la seua evolució al llarg del temps, sinó en una estimació mitjana d'alguna de les regions més estables (amb menor probabilitat de sofrir contaminació per artefactes sorollosos), el nostre càlcul de l'FrD per a cada registre es redueix a extraure la mitjana d'FrDs d'aquells

canals que hem considerat menys sorollosos i que ens aporta un major grau de confiança en quan a la localització i la puresa del senyal.

D'esta manera els EGMs van ser processats inicialment per mitjà de filtrat de la banda de freqüències d'interés (fins a 40Hz aproximadament) i excluint-ne el possible efecte de la component continua o línia base. Posteriorment, es duu a terme l'anàlisi espectral descrit anteriorment, per mitjà del càlcul de l'FFT fent ús del periodograma de Welch. La freqüència amb major potència espectral (amplitud) dins del rang de 3 a 25 Hz en l'espectre de potència, és considerada com la possible freqüència dominant. A continuació, se selecciona una finestra d'1 Hz al voltant d'aquest valor i es busca en l'espectre de potència realitzat al senyal original el pic amb major contingut espectral (el pic més alt) localitzat dins d'aquest en finestrat a la vegada que s'estima la concentració espectral d'aquest en finestrat entorn a la FrD determinada respecte a l'energia continguda en la banda d'interés.

A mode de resum, a continuació es mostra el diagrama de flux del programari desenvolupat per tal d'aplicar les tècniques de processat de senyal abans esmentades.

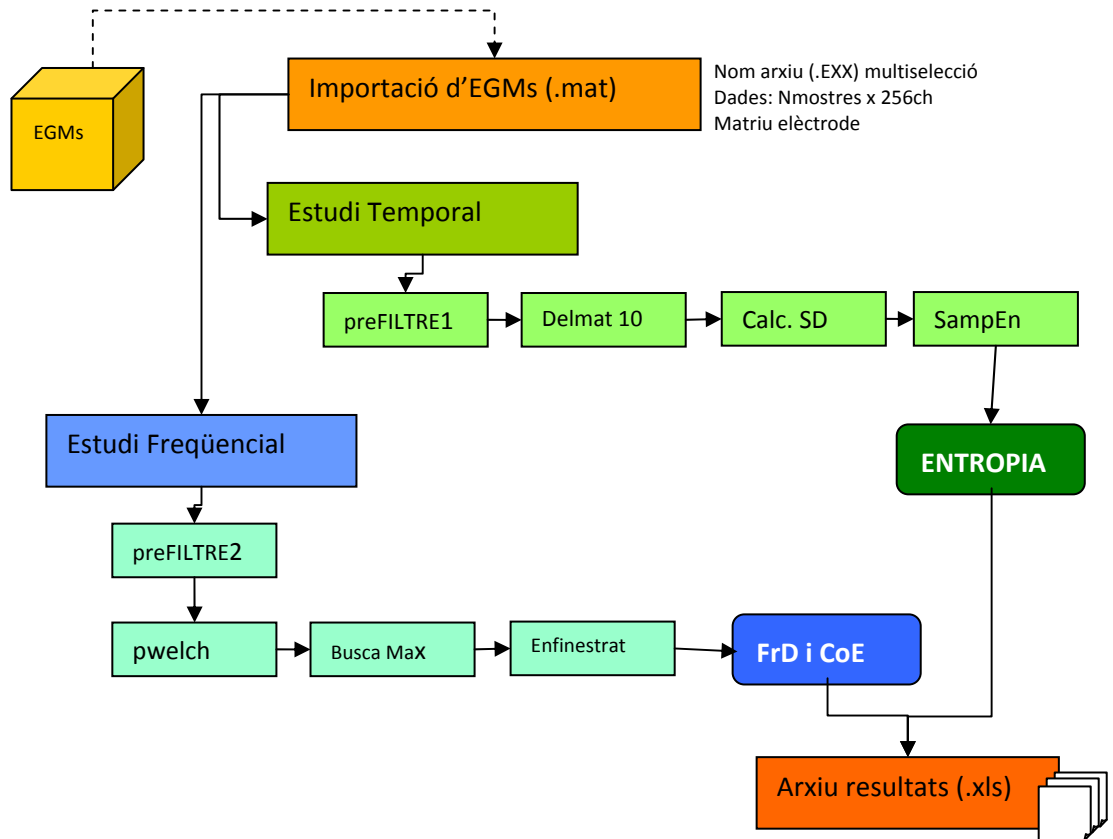


Figura 22. Diagrama de flux de les funcions programades amb MatLab©

**Descripció de blocs:**

**preFILTRE1 i preFILTRE2:** Filtrat elimina continua pas alt (Butterworth, ordre 10,  $f_{\text{tail}}=0,7$  Hz) i filtrat anti-interferències elimina banda (Butterworth, ordre 4,  $G=-10\text{dB}$  a  $[49,2- 50,8]$  Hz).

**Delmat10:** Realitza el delmat inicial per a guanyar resolució temporal.

**Calc.SD:** Càlcul de l'estadístic de la desviació estàndard, necessari per fixar la tolerància r.

**pwelch:** Crida a la funció de MatLab© amb els paràmetres ja comentats.

**BuscaMAX:** Búsqueda recursiva del pic màxim de potència i adjacents.

**Enfinestrat:** Càlcul bàsic de la concentració d'energia en  $\pm 1\text{Hz}$  (mètode simpson).

## 2.3 Anàlisi estadística

Per a la comparació, entre el grup de conills entrenats i el grup de conills control, en el present treball, hem utilitzat bàsicament dos tipus de tests estadístics. Per a l'estudi de l'energia llindar desfibril·ladora en la primera fase es va utilitzar el *test t d'Student* per a mostres no aparellades, i per a l'anàlisi dels casos de recurrència (variable qualitativa) de l'FV total es va utilitzar el test *khi quadrat* de Pearson ( $\chi^2$ ).

Per als paràmetres calculats de freqüència dominant i la seua concentració espectral, així com per a l'estimació de l'entropia mostral han estat usats novament l'estadístic *test t d'Student*.

Per a tots els casos s'han considerat els valors de  $p \leq 0,05$  com significatius.

A continuació es descriuen de manera ràpida en que consisteix cadascuna d'aquestes eines estadístiques i sota quines condicions s'ha escollit cadascuna en funció de les dades de que disposem.

### 2.3.1 Test t d'Student

En aquells casos en que es pretén comparar observacions efectuades amb dos o més grups poden donar-se dos tipus de dissenys: aquell en que les observacions es refereixen a dos grups independents d'individus (no aparellades o de mostres independents), o el cas en que cada sèrie de dades s'arregla en els mateixos subjectes baix condicions diferents (aparellades o de mostres dependents).

Com que el que ens interessa és comparar entre grups de dades provinents de dos grups de subjectes, es farà ús del *test t d'Student* per a dues mostres independents, introduint les modificacions necessàries en el cas que la variabilitat d'ambdós grups siga distinta.

Per poder aplicar aquest tipus de test s'ha de partir de la hipòtesi fonamental de la normalitat de les dades. En aquest cas, no obstant això, no serà necessari que les observacions en ambdós grups vinguen de poblacions normals, sinó que, únicament es requereix verificar la normalitat de la seua diferència.



### 2.3.2 Test $\chi^2$ de Pearson

En la investigació biomèdica ens trobem ben sovint amb dades o variables de tipus qualitatiu, mitjançant les quals un grup d'individus es classifiquen en dues o més categories mútuament excloents. És molt usual la necessitat de fer una comparació global de grups de freqüències d'aparició per un espai mostral.

Quan el que es pretén és comparar dos o més grups de subjectes respecte a una variable categòrica, els resultats se solen presentar com taules de doble entrada que reben el nom de taules de contingència. Així, la situació més simple de comparació entre dos variables qualitatives és aquella en que ambdós tenen només dos possibles opcions de resposta (és dir, variables dicotòmiques). En aquesta situació la taula de contingència es redueix a una taula dos per dos.

	Característica A	
Característica B	A afirmatiu	A negatiu
B afirmatiu	a	b
B negatiu	c	d

Taula 3. Taula de contingència 2x2

Per a aquest tipus de variables qualitatives el test que s'utilitza es denomina  $\chi^2$  o *khi quadrat* de Pearson<sup>6</sup>, i amb aquest test el que volem determinar és si la freqüència observada d'un fenomen és significativament igual a la freqüència teòrica prevista, o sí, al contrari, aquestes dues freqüències acusen una diferència significativa per a, per exemple, un nivell de significació del 5%.

---

<sup>6</sup> /*Khi*/ es pronuncia amb h aspirada, distingint de /*ji*/ al castellà o /*chi*/ a l'anglès

## 2.4 Legislació

La part experimental d'aquesta investigació va tindre lloc en els laboratoris del Departament de Fisiologia de la Universitat de València. Els treballs se van realitzar d'acord amb la legislació existent sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres fins científics, determinada per la directiva del Consell Europeu 86/609/CEE de 24 de novembre de 1986 i pel Conveni del Consell d'Europa de 18 de març de 1986 ratificat per Espanya en el Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres fins científics (B.O.E. 21 d'octubre de 2005).

### **3. RESULTATS**

### 3 RESULTATS

Els resultats del present estudi, seran expressats com a mitjana aritmètica i error estàndard en les diferents figures i com a mitjana aritmètica amb la seua desviació estàndard (DS) en les taules corresponents. Els tests estadístics aplicats per a l'anàlisi dels resultats han estat descrits en el capítol anterior.

#### 3.1 Energia lliandar de desfibril·lació

L'energia lliandar de desfibril·lació s'ha registrat tal i com ja s'ha comentat al capítol de mètodes seguint el protocol estipulat d'execució experimental. Les següents taules contenen els resultats de totes les mostres sotmeses a estudi (conills) que conformaven la nostra població final (8 conills control i 8 conills entrenats), així com les mitges obtingudes i les seues desviacions estàndard. Com es pot observar, a continuació, la primera taula (taula 4) correspon als resultats del grup control i la segona (taula 5) al grup entrenat.

L'energia lliandar (mínima) necessària per aconseguir una desfibril·lació definitiva (sense recurrència) s'expressa com la mitjana aritmètica entre els conills del mateix grup i es compara entre els dos grups.

D'esta manera s'ha obtés aquesta diferència de mitges (amb les respectives desviacions) i s'ha comprovat la significació ( $p < 0.05$ ) de la hipòtesi on ens preguntem si existeix relació inherent entre el fet de pertànyer a un grup determinat i la major o menor quantitat d'energia necessària per a una desfibril·lació amb èxit.

Com ja s'ha comentat abans, per respondre a aquesta pregunta, s'usa el test *t d'Student* per la qual cosa, al tractar-se de conills diferents distribuïts normalment en dos grups, l'aplicarem per al cas de variables independents o no aparellades.

<b>CONTROL</b>	<b>FASE 1 : DesFV immediata</b>	<b>FASES 1 i 2</b>
<b>Identificador</b>	<b>ELDI (j)</b>	<b>Recurrències</b>
ENDESFVCO1	0,17	Si
ENDESFVCO2	0,24	Si
ENDESFVCO3	0,11	No
ENDESFVCO4	0,11	Si
ENDESFVCO5	0,16	Si
ENDESFVCO6	0,12	No
ENDESFVCO7	0,12	No
ENDESFVCO8	0,21	Si
<b>Total recurrències</b>		<b>5</b>
<b>mitjana</b>	<b>0,16</b>	
<b>DS</b>	<b>0,05</b>	

Taula 4. Valors de llindar desfibril latori i de recurrència per al grup CONTROL

<b>ENTRENAT</b>	<b>FASE 1 : DesFV immediata</b>	<b>FASES 1 i 2</b>
<b>Identificador</b>	<b>ELDI (j)</b>	<b>Recurrències</b>
ENDESFVEN1	0,14	No
ENDESFVEN2	0,11	No
ENDESFVEN3	0,07	No
ENDESFVEN4	0,09	No
ENDESFVEN5	0,12	No
ENDESFVEN6	0,14	No
ENDESFVEN7	0,10	No
ENDESFVEN8	0,17	No
<b>Total recurrències</b>		<b>0</b>
<b>mitjana</b>	<b>0,12</b>	
<b>DS</b>	<b>0,03</b>	

Taula 5. Valors de llindar desfibril latori i de recurrència per al grup ENTRENAT

### 3.1.1 Energia Llindar Desfibril·latria Immediata (ELDI)

L'energia llindar per al cas de la desfibril·lació immediata (primera fase del protocol experimental) obtesa, manifesta un major requeriment energètic, al voltant d'un 36.17% més, per al cas dels conills del grup control ( $0,16 \pm 0,05$  J) que per als del grup entrenat ( $0,12 \pm 0,03$  J), tal i com es mostra en el següent gràfic.

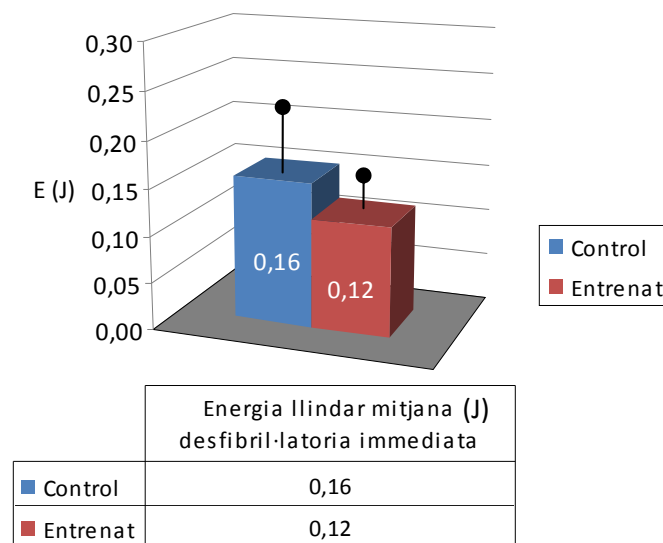


Figura 23. Comparativa del llindar desfibril·latri immediat

Assumint que, per ser la primera fase del protocol no hi ha influència de cap efecte anterior i per tant és tracta d'un fenomen independent, podem doncs fer ús d'una anàlisi estadística del tipus *t d'Student* per a mostres independents. Aplicant l'estadístic obtenim una **p=0,043** ( $p < 0,05$ ) i per tant indicatiu de que el conill entrenat, almenys en el nostre model experimental, requereix menor energia de xoc desfibril·latri, davant un hipotètic episodi d'FV, durant els primers instants immediats a l'aparició de l'arítmia.

### 3.2 Recurrència de la fibril·lació ventricular

La recurrència de la fibril·lació ventricular ha estat mesurada com un paràmetre global dels assajos. De manera que, hi intervenen, per a cada conill, successos de l'experiment al complet (fases 1 i 2), però dels quals sols s'ha computat el fet de que una preparació (un conill) fós incapaç d'assolir una desfibril·lació reeixida (amb èxit i ritme sinusal estable), marcant aquesta com recurrent, sense entrar en consideració quantes vegades ho ha estat.

D'esta manera el còmput total de conills del grup control que han mostrat successos de recurrència han estat 5 (sobre 8), front a que en el grup entrenat no hi ha hagut cap cas de recurrència. Front a les condicions d'aquesta variable de resultat s'aplica un anàlisi estadístic del tipus *khi quadrat*, obtenint-se una **significació  $p=0,007$**  ( $p<0,05$ ).

En la següent taula s'hi poden apreciar els càlculs resultants de l'estadístic *khi quadrat*.

Casos recurrència			
Grup	Si	No	Total
Control	5	3	8
Entrenat	0	8	8
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>16</b>

Casos recurrència			
Grup	Si	No	Total
Control	62,5%	37,5%	100,0%
Entrenat	0,0%	100,0%	100,0%
<b>Total</b>	<b>31,3%</b>	<b>68,8%</b>	<b>100,0%</b>

Valors observats		Valors esperats	
a	5	a	2,5
b	3	b	5,5
c	0	c	2,5
d	8	d	5,5

Casos recurrència			
Grup	Si	No	Total
Control	100,0%	27,3%	50,0%
Entrenat	0,0%	72,7%	50,0%
<b>Total</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>

<b>Khi-quadrat</b>	<b>7,27</b>	<b>p = 0,0070</b>
--------------------	-------------	-------------------

Taula 6. Estadístic *khi quadrat* de la recurrència

### 3.3 Anàlisi temporal: Entropia

L'entropia ha estat calculada segons s'hi ha descrit en l'apartat metodològic, obtenint-se valors per a la totalitat de canals, discriminant-se aquell grup de canals en què es té la certesa de representació del fenomen.

D'esta manera, es mostren els resultats per a un canal concret (amb millors resultats) i una estimació de la mitjana teòrica ( $1,98 \pm 0,25$  u.a. en controls i  $1,73 \pm 0,72$  u.a. en entrenats) per a cada grup.

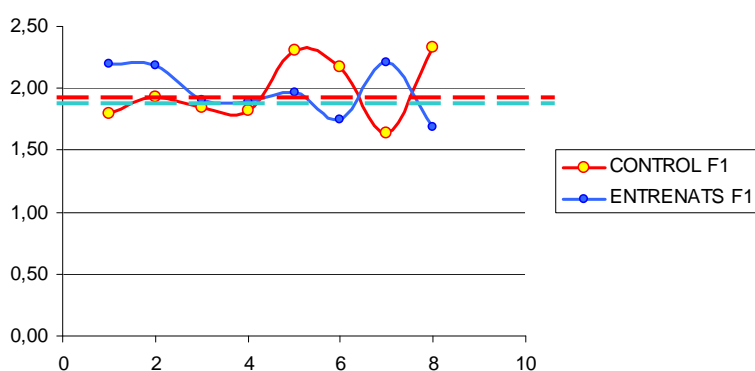


Figura 24. Entropies del senyals d'Fv en la primera fase del protocol

L'avaluació de l'estadístic amb la prova de t d'Student **no otorga significació** a les diferències entre grups durant la primera fase del protocol ( $p=0,195$ ). A més, els valors dels resultats, semblen ser elevats en comparació amb la bibliografia consultada (en la major part dels casos versades en l'estudi de la fibril·lació auricular amb EGMs bipolars, que poden no ser del tot interpolables al cas de l'FV), manifesten, en general, una desorganització patent.



### 3.4 Anàlisi freqüencial: Freqüència dominant i Concentració espectral

El càlcul de les mitjanes de les freqüències dominants ( $18,669 \pm 4,152$  Hz en controls i  $17,945 \pm 4,550$  Hz en entrenats) per a la primera fase **no ha mostrat diferències significatives** entre grups. Així mateix tampoc ho ha fet amb les respectives concentracions espectrals a  $\pm 1$ Hz entorn a aquestes FrD ( $29,1 \pm 5,8$  %u.a. en controls i  $28,5 \pm 5,6$  %u.a. en entrenats).

Es mostren els resultats per a la mitjana dels registres en comparació del grup de conills control front a l'entrenat.

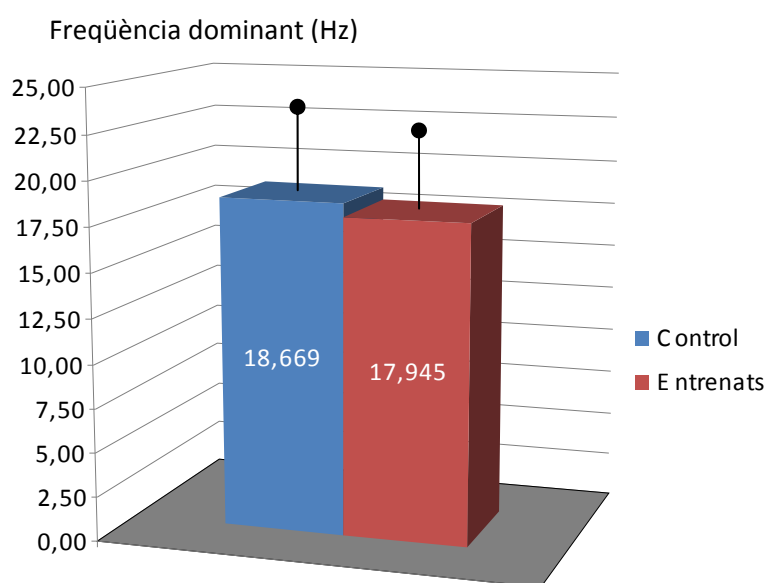


Figura 25. Comparativa de freqüències dominants per a controls i entrenats

L'estadístic aplicat, contempla l'estimació independent (*t d'Student*) per a la primera fase, en que es considera que no hi ha influència d'un estadi anterior, resultant no significatiu ( $p=0,372$  per a les FrDs i  $p=0,431$  per a les CoEs).

### 3.5 Resum de resultats estadístics

A mode de resum de resultats tenim que:

- En quan a la recurrència **han estat significatives** les diferències trobades entre el grup control i l'entrenat (5 casos en control i cap en entrenat, sobre una població de 8 conills en cada grup), aplicant-se la prova *khi quadrat* amb un resultat de  $p=0,007 < 0,05$ .
- En quan a la resta de paràmetres baix estudi, a continuació es mostra la següent taula resum on s'hi poden veure els estadístics i la significació de les diferències entre grups :

		DesFV immediata			
		ELD (J)	Entropia (u.a.)	FrD (Hz)	CoEsp (u.a.)
Mitjanes i desviació	CONTROL	0,16 ± 0,05	1,98 ± 0,25	18,67 ± 4,15	0,29 ± 0,06
	ENTRENATS	0,12 ± 0,03	1,73 ± 0,72	17,95 ± 4,55	0,29 ± 0,06
Estadístic (p)	t d'Student	0,046	0,195	0,372	0,431
Significació (p<0,05)		SI	NO	NO	NO

Taula 7. Taula resum dels estadístics i la significació dels paràmetres estudiats

## 4. DISCUSSIÓ

## 4 DISCUSSIÓ

En el present treball, hem investigat en preparacions amb cors aïllats de conills entrenats en cinta rodant, seguint el protocol descrit en el capítol relatiu a metodologia, l'efecte de l'entrenament sobre el llindar desfibril·latori, la recurrència fibril·latòria, l'entropia del senyal i la freqüència dominant de la fibril·lació ventricular.

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

Tal i com justifiquem en el capítol d'introducció, pensem que la nostra investigació posseeix un interès científic bàsic, i de probable aplicació en clínica humana. L'interès científic bàsic, deriva de la relativament escassa informació de què es disposa del problema plantejat; i l'interès en clínica humana deriva dels estudis realitzats per diversos autors sobre l'efecte que produeix l'exercici físic regular sobre la prevenció, directa o indirectament, de diversos tipus d'arítmies cardíques que són causa de la mortalitat d'origen cardíac (Paffenbarger i Hale, 1975, Ekelund et al., 1988, Blair et al., 1996), com és la fibril·lació ventricular, que és la causa principal de mort sobtada d'origen cardíac (Billman et al., 2002).

### 4.1 Consideracions respecte a la metodologia

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

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

ventricular, difícilment es formen en aquests animals, tal com exposa Billman (2002) en una revisió.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 4.2 Consideracions respecte als resultats

### 4.2.1 Respecte a l'energia necessària per a revertir el procés fibril·latori

Com veiem en el capítol de resultats, l'energia necessària per desfibrillar els cors dels animals entrenats ha estat menor que en el control. Aquest resultat l'interpretem com un efecte clarament beneficiós de l'exercici físic de resistència regular que podria assentar-se sobre altres efectes relacionats amb paràmetres com l'heterogeneïtat electrofisiològica del miocardi ventricular.

Aquest resultat s'ha pogut obtenir gràcies a l'ús d'un desfibril·lador dissenyat *ad hoc* per a aquest tipus d'estudis, que ens ha permès, tal com descrivim en detall en l'apartat de mètodes, l'aplicació d'ones bifàsiques de xoc amb energia ajustable entre 0,05 J i 2,99 J en increments molt reduïts d'energia (0,01J). Amb la informació que disposem, sembla que el nostre mètode és innovador en tant que no han estat utilitzats prèviament incrementals d'energia tan reduïts per cap altre grup d'investigació tal i com s'hi pot consultar en la bibliografia existent.

Tot i el gran nombre d'investigacions dutes a terme i el fet que els mecanismes bàsics de la desfibril·lació continuen sent debatuts (Chen et al. 1998, Dillon et al. 1998, Efimova et al. 1998, Chattipakorn et al. 2001), hi ha investigacions que relacionen la facilitat per desfibrillar el cor amb la dispersió de la repolarització (expressió de la heterogeneïtat electrofisiològica) produïda pels xocs elèctrics (Dillon 1992, Knisley et al. 1992), com hem indicat més endavant.

La possible relació d'aquests resultats amb les dades d'heterogeneïtat electrofisiològica obtinguts a partir de l'anàlisi de les característiques de la fibril·lació ventricular realitzat en el present estudi (les dades sobre entropia obtingudes a partir del processat del senyal en el domini temporal i, les dades de freqüències dominants obteses a partir de l'anàlisi freqüencial) no sembla permetre, en el nostre cas, establir una relació entre l'heterogeneïtat miocàrdica i la menor energia necessària per a revertir el procés fibril·latori.

De fet, i com comentarem més endavant en detall, els paràmetres d'heterogeneïtat investigats (entropia i FrD) no presentaren diferències significatives al comparar entre grups, com hem vist en l'apartat de resultats. Contrasten aquests últims resultats relatius a les característiques de la fibril·lació ventricular, amb altres observacions realitzades pel nostre propi grup i en les que l'exercici físic va exercir efectes sobre la major dispersió dels valors de freqüència dominant mitjana de la fibril·lació ventricular en animals no entrenats en comparació amb els sotmesos a protocols d'exercici físic (Pelechano et al., 2007, Such-Miquel et al, 2008, Parra, observacions no publicades).

No obstant les anteriors consideracions, Chattipakorn et al. (2001), realitzant un estudi en porcs i amb un sistema de mapeig òptic per tal d'investigar el mecanisme de la desfibril·lació fent ús de xocs a prop de l'indiar desfibril·latori no van trobar relació entre l'èxit de la desfibril·lació o el decés de la mateixa i un paràmetre d'heterogeneïtat escollit definit com la dispersió global del potencial d'acció immediat al post-xoc (Chattipakorn et al. (2001).

#### 4.2.2 Respecte a la recurrència total de la fibril·lació ventricular

Com indiquem en la metodologia, després de la desfibril·lació, una segona inducció de la fibril·lació, de 180 segons de durada, va ser duta a terme, després de la qual es va procedir novament a la desfibril·lació. Tant en el cas de la primera fibril·lació (desfibril·lació immediata) com en el de la segona (desfibril·lació prolongada), en alguns cors, un cop desfibril·lats, es va tornar a instaurar espontàniament la fibril·lació ventricular i cessà el ritme sinusal, fenomen conegut com recurrència o recidiva.

Com ja hem vist prèviament, es va determinar el nombre total de recidives en ambdós grups d'animals i trobem que cap dels cors entrenats recidivà, la qual cosa va contrastar amb el que va passar amb el grup control en què hi va haver recidives fibril·latòries en més d'un 60% dels casos.

Igual que comentem per al cas de l'energia mínima necessària per desfibril·lar, el resultat relatiu a les recidives ho considerem molt important des del punt de vista de la investigació bàsica, així com des del punt de vista de l'efecte beneficiós de l'exercici físic crònic. En la nostra opinió, el manteniment de l'arítmia fibril·latòria o la seva desaparició després de la desfibril·lació, no sembla estar relacionat amb el grau d'homogeneïtat electrofisiològica del miocardi ventricular.

Açò últim contrasta amb les investigacions d'autors que van estudiar el paper de les heterogeneïtats ventriculars pel que fa a la vulnerabilitat als xocs elèctrics i que, efectivament, sí que van trobar una relació entre aquestos paràmetres.

Maharaj et al. 2008 usant un model computacional per tal d'estudiar el paper de les heterogeneïtats en corrents iòniques i l'acoblament de les unions íntimes (nexus o gap junctions) en la generació d'arítmies (fent servir xocs elèctrics monofàsics basats en l'exponencial truncada), van trobar que, la inclusió d'heterogeneïtats transmursals en els corrents iònics es va vore reflectida per un increment en la vulnerabilitat als xocs i un engrandiment de la finestra de vulnerabilitat (Maharaj et al. 2008).

Aquests canvis, segons l'opinió dels esmentats investigadors, deriven d'un increment post-xoc de la dispersió en la repolarització, en la mesura que això incrementa la probabilitat de l'establiment de circuits reentrants.



A la vista dels resultats, pel que fa a l'aparició de recidives i els paràmetres d'heterogeneïtat investigats, cal pensar, igual que férem per al llindar desfibril·latori, que també en aquest cas puguen estar implicats altres mecanismes bàsics que intervindrien en el manteniment del cor en ritme sinusal una vegada desfibril·lat.

Arrel de tot el que hem presentat en aquest treball i dels resultats obtesos, sorgeix la motivació necessària per continuar investigant possibles mecanismes pels quals els cors d'animals sotmesos a protocols d'exercici físic crònic presenten un ritme post-xoc desfibril·latori més estable i les relacions que d'aquestes s'estableixen amb l'exercici físic crònic.

### 4.3 Limitacions de l'estudi

Algunes de les limitacions observades han estat:

- La limitació inicial amb que ens enfrontem és que els resultats i les conclusions que es puguin obtenir sempre vindran condicionades a que no es possible extrapolar aquestos del nostre model d'experimentació animal a la pràctica clínica amb humans. No obstant aquesta limitació es té assumida sense restar importància a la relevància de la investigació bàsica.
- Respecte al sistema de perfusió de Langerdorff utilitzat en el present estudi experimental s'ha de comentar que es podrien aconseguir unes condicions més semblants a les fisiològiques que reconstruir amb major exactitud les condicions reals de treball del miocardi. Açò, ho podríem aconseguir amb un sistema de perfusió de Langendorff però forçant al miocardi a realitzar treball (*working heart*). Efectivament, aquesta metodologia afegeix una nova variable independent a l'estudi com seria el treball amb càrrega del cor, tant en lo que a precàrrega (tensió miocàrdica deguda al ompliment telediastòlic ventricular) es refereix com a poscàrrega (tensió miocàrdica deguda al buidament ventricular en la artèria aorta, dins la qual hi ha una pressió).
- El model de fibril·lació, en els nostres experiments, ocorre sense que la perfusió siga interrompuda, situació aquesta que no es dona en la realitat en els casos de fibril·lació dels humans, en la qual hi ha una desaparició del flux coronari i la consegüent isquèmia, que condueix a un procés lesiu i, com a conseqüència, a una modificació de la freqüència de la fibril·lació pròpia dels processos isquèmics.
- Tampoc no sabem exactament la correspondència entre l'exercici físic regular en humans i el protocol d'entrenament aplicat per nosaltres als animals.
- La limitació pròpia de la població mostral que, si bé sigui suficient, potser resulte un poc baixada i siga necessari ampliar l'espai mostral.
- La limitació pròpia de l'error sistemàtic introduït pels sistemes o les capacitats pròpies de la instrumentació del laboratori: aparició d'harmònics sorollosos deguts a la saturació pel guany dels EGM, impossibilitat de registrar l'activitat cardíaca durant l'aplicació d'un xoc desfibril·lador, l'adaptació entre el cor i la concavitat de l'elèctrode múltiple de registre o la limitació entre la resolució temporal de l'equip desfibril·lador i l'estimació de la càrrega.
- Per últim, destacar la falta de consens existent entre la comunitat investigadora pel que fa a la proposta de paràmetres, coeficients i índexs (quantificadors i reproduïbles) que puguin donar una estimació de l'heterogeneïtat.

## **5. CONCLUSIONS**

## 5 CONCLUSIONS

Hem estudiat en un model de cor aïllat en fibril·lació ventricular, procedent de conills sotmesos a un protocol d'exercici físic regular en tapis rodant:

L'energia mínima necessària per a revertir el procés fibril·latori, i l'estabilització del ritme sinusal una vegada aconseguida la desfibril·lació, mitjançant xocs bifàsics amb un equip fou dissenyat *ad hoc* pel grup d'investigació Bio-ITACA de la Universitat Politècnica de València.

Així mateix han estat investigats paràmetres d'heterogeneïtat electrofisiològica, que podrien explicar els resultats obtinguts. Les conclusions han estat que:

1. L'exercici físic regular podria protegir beneficiosament al cor actuant sobre mecanismes electrofisiològics que permetrien una menor quantitat d'energia per a revertir la fibril·lació ventricular.
2. L'exercici físic regular podria protegir beneficiosament al cor actuant sobre mecanismes electrofisiològics que permetrien mantenir un ritme sinusal estable després del cessament de la fibril·lació a través de l'aplicació de xocs elèctrics d'ones bifàsiques.
3. No s'han trobat diferències significatives en paràmetres freqüencials clàssics, com ho són la freqüència dominant i la concentració espectral, entre entrenats i control.
4. Tampoc s'han trobat diferències significatives en el domini temporal mitjançant un paràmetre actual i prometedor, segons la bibliografia, com és l'entropia.
5. D'altres mecanismes que no són l'heterogeneïtat electrofisiològica del miocardi podrien estar implicats en l'efecte protector exhibit per l'exercici físic.

## **6. LÍNIES FUTURES**

## 6 LÍNIES FUTURES

Arrel de les limitacions observades i les conclusions exposades en anteriors apartats es plantegen línies futures d'investigació que impliquen:

- L'elaboració d'un nou protocol experimental per a una futura sèrie d'experiments amb model de cor aïllat de conill, augmentant l'espai mostral i corregint, si escau, el protocol d'entrenament a què es veuen sotmesos.
- La millora en l'equipament de registre, permetent-ne el registre durant el procés de desfibril·lació i una millor adaptació a l'anatomia del cor.
- L'ampliació de l'estudi a l'anàlisi i el càlcul d'altres paràmetres que es puguen relacionar amb l'heterogeneïtat, com és el cas de l'índex d'organització (Everett et al. 2001) o el seguiment de l'evolució temporal de l'FV per tal de quantificar la complexitat d'aquesta arítmia mitjançant mètodes basats en l'aïllament espai-temporal dels fronts d'activació miocàrdic, fent servir la informació espacial que ens aporta la distribució de l'elèctrode multicanal utilitzat i que es troba en fase de desenvolupament complet i inici de validació per part del nostre grup d'investigació.

## **7. CONTRIBUCIONS**

## 7 CONTRIBUCIONS

A continuació s'esmenten les contribucions que han aportat la realització del present estudi que ha estat realitzat dins el marc d'un projecte multidisciplinari en que han col·laborat els grups de treball de bioenginyeria (Bio\_ITACA) i d'electrofisiologia cardíaca (GRELCA), provinents d'àrees de coneixement complementaries que encaixen perfectament en la definició conjunta de la investigació en l'àmbit de l'enginyeria biomèdica.

### 7.1 Publicacions

El present treball ha estat motiu de presentació a les següents comunicacions en congressos:

- **Effects of physical training on the ventricular fibrillation recurrence after application of energy shocks with defibrillator and on the energy level to revert this arrhythmia. An experimental study.**
  - Congrès: European Sports Medicine Congress
  - Edició: 6th European Sports Medicine Congress (Antalya, Turkey)
  - Data: 17/10/2009
  
- **Experimental study on the effects of physical training on the defibrillation threshold.**
  - Congrès: International Congress on Electrocardiology
  - Edició: 37th International Congress on Electrocardiology (Lund, Sweden)
  - Data: 03/06/2010



## 7.2 Projectes d'investigació.

Aquest treball ha estat realitzat en el marc del projecte multidisciplinari, dividits en tres subprojectes, que ha tingut una duració de 3 anys (2006/2009):

- **Títol del projecte: EFECTOS ELECTROFISIOLOGICOS DEL EJERCICIO FÍSICO CRÓNICO SOBRE LA EXCITABILIDAD INTRÍNSECA MIOCÁRDICA VENTRICULAR, Y SOBRE SUS MODIFICACIONES POR DISMINUCIÓN DE LA PERFUSIÓN MIOCÁRDICA REGIONAL AGUDA (DEP2006-56208-C03-01)**
  - Entitat finançadora: MINISTERI DE CIÈNCIA I INNOVACIÓ
  - Investigador principal: Luis Such Belenguer
  
- **Títol del projecte: EFECTOS ELECTROFISIOLÒGICOS DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE LA EXCITABILIDAD MIOCÁRDICA INTRÍNSECA. TÉCNICAS INSTRUMENTALES (DEP2006-56208-C03-02)**
  - Entitat finançadora: MINISTERI DE CIÈNCIA I INNOVACIÓ
  - Investigador principal: José Millet Roig
  
- **Títol del projecte: EFECTOS ELECTROFISIOLÒGICOS DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE LA EXCITABILIDAD MIOCÁRDICA INTRÍNSECA. ANÁLISIS DE LAS SEÑALES (DEP2006-56208-C03-03)**
  - Entitat finançadora: MINISTERI DE CIÈNCIA I INNOVACIÓ
  - Investigador principal: Antonio Cebrián Ferriols

## 8. ANNEXES

## 8 ANNEXES

### 8.1 Desenvolupament matemàtic de l'estimador periodograma

L'espectre de potència d'un procés aleatori estacionari en sentit ampli és la transformada de Fourier de la seqüència d'autocorrelació.

$$S_x(e^{j\omega}) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} r_x(k) e^{-jk\omega}$$

Per a un procés ergòdic en autocorrelació i una quantitat il·limitada de dades, la seqüència d'autocorrelació pot ser obtinguda mitjançant la mitjana temporal.

$$r_x(k) = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{2N+1} \sum_{n=-N}^N x(n)x^*(n-k)$$

Però si el senyal  $x(n)$  és conegut únicament en un interval finit (per a  $n = 0, 1, \dots, N-1$ ), llavors la seqüència d'autocorrelació s'ha d'estimar mitjançant una suma finita; si a més ens assegurem de que els valors de  $x(n)$ , fora de l'interval  $[0, N-1]$ , estan exclosos del sumatori, l'equació anterior queda de la següent manera:

$$\hat{r}_x(k) = \frac{1}{N} \sum_{n=k}^{N-1} x(n)x^*(n-k) \quad ; k = 0, 1, \dots, N-1$$

Aplicant la transformada de Fourier a la seqüència d'autocorrelació calculada, obtenim l'estimador espectral de potència denominat periodograma:

$$\hat{S}_x(e^{j\omega}) = \sum_{k=-N+1}^{N-1} \hat{r}_x(k) e^{-jk\omega}$$

De vegades, pot resultar més convenient expressar el periodograma en funció del procés  $x(n)$ . Suposem que  $x(n)$  és una seqüència de longitud  $N$ , igual a  $x_N(n)$  en l'interval  $[0, N-1]$ , i zero fora d'aquest interval. D'aquesta manera, podem considerar  $x_N(n)$  com el producte de  $x(n)$  amb una finestra rectangular  $w_R(n)$ :

$$x_N(n) = w_R(n) x(n)$$

Llavors tenim, en termes d' $x_N(n)$  que:

$$\hat{r}_x(k) = \frac{1}{N} \sum_{n=-\infty}^{\infty} x_N(n) x_N^*(n-k) = \frac{1}{N} x_N(k) * x_N^*(-k)$$

Que, prenent la TF i aplicant el teorema de la convolució, el periodograma adquireix la forma:

$$\hat{S}_x(e^{j\omega}) = \frac{1}{N} X_N(e^{j\omega}) X_N^*(e^{j\omega}) = \frac{1}{N} |X_N(e^{j\omega})|^2$$

Així, el periodograma és proporcional al quadrat de la transformada discreta d' $x_N(n)$ , i es pot calcular fàcilment de la següent manera:

$$x_N(n) \xrightarrow{DFT} X_N(k) \rightarrow \frac{1}{N} |X_N(k)|^2 = \hat{S}_{per}(e^{j2\pi k/N})$$

### Problemàtica del periodograma

Sabent ja que el periodograma és proporcional al quadrat de la transformada de Fourier del senyal enfinestrat:

$$x_N(n) = w_R(n) x(n)$$

$$\hat{S}_x(e^{j\omega}) = \frac{1}{N} X_N(e^{j\omega}) X_N^*(e^{j\omega}) = \frac{1}{N} |X_N(e^{j\omega})|^2$$

I observant l'equació del valor esperat del periodograma:

$$E\{\hat{S}_{per}(e^{j\omega})\} = \frac{1}{2N} S_x(e^{j\omega}) * |W_R(e^{j\omega})|^2$$

Deduïm que el suavitzat produït en el periodograma ve determinat per la finestra que s'aplique a les dades.

Encara que la finestra rectangular té un lòbul principal estret comparat amb altres finestres, i, per això, proporciona una quantitat mínima d'allisat espectral, té lòbuls laterals relativament grans, que tendeixen a emascarar components de banda estreta de baixa potència. La reducció d'amplitud dels lòbuls laterals es pot dur a terme a costa d'un increment en l'amplada del lòbul principal, el que dona lloc a una menor resolució.

Aquesta és la raó per la qual el periodograma modificat utilitza diferents tipus de finestres.

Suposem que definim la resolució del periodograma modificat com l'ample de banda a 3 dB de la finestra de dades:

$$\text{Re } s \left[ \hat{S}_M(e^{j\omega}) \right] = (\Delta\omega)_{3dB}$$

Lavors tindrem una taula comparativa de diferents tipus de finestres utilitzades:

Finestra	Nivell lòbul secundari	Resolució 3 dB BW
Rectangular	-13	$0.89(2p/N)$
Bartlett	-27	$1.28(2p/N)$
Hanning	-32	$1.44(2p/N)$
Hamming	-43	$1.30(2p/N)$
Blackman	-58	$1.68(2p/N)$

Podem observar una reducció en l'amplitud del lòbul secundari, produïda en aplicar una finestra diferent de la rectangular, però el valor de la resolució creix, és a dir, augmenta la separació mínima entre components espectrals que serem capaços de discriminar.

## **9. BIBLIOGRAFIA**

## 9 BIBLIOGRAFIA

Abásolo D, Hornero R, Espino P, Alvarez D, Poza J, Entropy analysis of the EEG background activity in Alzheimer's disease patients, *Physiol. Meas.* 27(3): 241–253, 2006.

Al-Angari H.M., Sahakian A.V., Use of sample entropy approach to study heart rate variability in obstructive sleep apnea syndrome, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 54 (10) 1900–1904. 2007.

Alcaraz R., J.J. Rieta, A non-invasive method to predict electrical cardioversion outcome of persistent atrial fibrillation, *Med. Biol. Eng. Comput.* 46 (7) 625–635. 2008a.

Alcaraz R., J.J. Rieta, Wavelet bidomain sample entropy analysis to predict spontaneous termination of atrial fibrillation, *Physiol. Meas.* 29 (1) 65–80. 2008b.

Alcaraz R., J.J. Rieta, Non-invasive organization variation assessment in the onset and termination of paroxysmal atrial fibrillation, *Comput. Methods Programs Biomed.* 93 (2) 148–154. 2009.

Alcaraz R, Rieta JJ. A review on sample entropy applications for the non-invasive analysis of atrial fibrillation electrocardiograms. *Biomedical Signal Processing and Control* 5: 1-14, 2010.

Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol.* 96(6): 517-27, 2001.

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

Barnard RJ, Peter JB. Effect of training and exhaustion on hexokinase activity of skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 27(5):691-5. 1970.

Bedford TG, Tipton CM. Exercise training and the arterial baroreflex. *J Appl Physiol.*;63(5):1926-32.1987.

Berenfeld O, Mandapati R, Dixit S, Skanes AC, Chen J, Mansour M, Jalife J. Spatially distributed dominant excitation frequencies reveal hidden organization in atrial fibrillation in the Langendorff-perfused sheep heart. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 11(8): 869-79, 2000.

Blair SN, Kampert JB, Kohl HW 3rd, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS Jr, Gibbons LW. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA*. 17;276(3):205-10. 1996.

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

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

Bouchard C, Dionne FT, Simoneau JA, Boulay MR. Genetics of aerobic and anaerobic performances. *Exerc Sport Sci* 20:27-58, 1992

Brorson L, Conradson TB, Olsson B and Varnauskas E. Right atrial monophasic action potential and effective refractory periods in relation to physical training and maximal heart rate. *Cardiovasc Res* 10: 160-168, 1976.

Brown CG, Griffith RF, Van Ligten P, Hoekstra J, Nejman G, Mitchell L, Dzwonczyk R. Median frequency--a new parameter for predicting defibrillation success rate. *Ann Emerg Med*. 20(7):787-9, 1991.

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

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

Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*. 100(2):126-31. 1985.

Cervigón R. Signal processing of intracardiac recordings for the evaluation of propofol effects during atrial fibrillation. 2009a

Cervigón R, Moreno J, Reilly RB, Pérez-Villacastín J, Castells F. Ventricular rhythm in atrial fibrillation under anaesthetic infusion with propofol. *Physiol Meas*. 30(8):833-45. 2009b.



Cervigón R, Moreno J, Millet-Roig J, Perez-Villacastin J, Castells F. Propofol Effects on Atrial Fibrillation Wavefront Delays. *IEEE Trans Biomed Eng* Feb 5. 2010.

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

Chattipakorn N, Banville I, Gray RA and Ideker RE. Mechanism of Ventricular Defibrillation for Near-Defibrillation Threshold Shocks. A Whole-Heart Optical Mapping Study in Swine. *Circulation* 104: 1313-1319, 2001.

Chen PS, Swerdlow CD, Hwang C, and Karagueuzian HS. Current concepts of ventricular defibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9: 553-562, 1998.

Chesnokov Y.V., Complexity and spectral analysis of the heart rate variability dynamics for distant prediction of paroxysmal atrial fibrillation with artificial intelligence methods, *Artif. Intell. Med.* 43 (2) 151-165. (2008).

Chorro FJ, Such L, and Lopez-Merino V. Animal models of cardiovascular disease. *Revista Espanyola de Cardiología.* 62(1): 69-84, 2009.

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

Cooley James W. and Tukey John W. An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series. *Mathematics of Computation*, Vol. 19, No. 90 pp. 297-301, 1965

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

De Schryver C, Mertens-Strythagen J. Heart tissue acetylcholine in chronically exercised rats. *Experientia.* Mar 15;31(3):316-8. 1975

DiCarlo SE, Bishop VS. Regional vascular resistance during exercise: role of cardiac afferents and exercise training. *Am J Physiol.* 258(3 Pt 2):H842-7. 1990

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

Dillon, S.M. Synchronized repolarization after defibrillation shocks: a possible component of the defibrillation process demonstrated by optical recordings in rabbit heart. *Circulation* 85, 1865-1878. 1992.

Efimov, I.R., Cheng, Y., Van Wagoner, D.R., Mazgalev, T. and Tchou PJ. Virtual electrode-induced phase singularity: a basic mechanism of defibrillation failure. *Circ Res* 82, 918 -925. 1998.

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

Ekelund LG, Haskell WL, Johnson JL, Whaley FS, Criqui MH, Sheps DS. Physical fitness as a predictor of cardiovascular mortality in asymptomatic North American men. The Lipid Research Clinics Mortality Follow-up Study. *N Engl J Med.* 24;319(21):1379-84. 1988 .

Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R, Fleg J, Froelicher VF, Leon AS, Piña IL, Rodney R, Simons-Morton DG, Williams MA and Bazzarre T. Exercise Standards for Testing and Training. A Statement for Healthcare Professionals. *Circulation* 104: 1694-1740, 2001.

Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R, Fleg J, Froelicher VF, Leon AS, Piña IL, Rodney R, Simons-Morton DG, Williams MA and Bazzarre T. Exercise Standards for Testing and Training. A Statement for Healthcare Professionals. *Circulation* 104: 1694-1740, 2001.

García Civera R, Morell Cabedo S, González Hernández E, Muñoz Gil J, Ruiz Granell R, Sanchís Fores J, Llavador Sanchís J. Acute electrophysiologic effects of propafenone in patients with accessory pathways *Rev Esp Cardiol*;40(4):261-6. 1987.

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

Gonzalez NC, Clancy RL. Mechanism of the effect of alkalosis on maximum oxygen uptake in hypoxic exercise. *Respir Physiol.* 87(2):243-54 1992.

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

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

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

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

Hartley LH, Mason JW, Hogan RP, Jones LG, Kotchen TA, Mougey EH, Wherry FE, Pennington LL, Ricketts PT. Multiple hormonal responses to prolonged exercise in relation to physical training. J Appl Physiol. Nov;33(5):607-10. 1972

Hartley LH, Grimby G, Kilbom A, Nilsson NJ, Astrand I, Bjure J, Ekblom B and Saltin B. Physical training in sedentary middle-aged and older men: cardiac output and gas exchange during submaximal and maximal exercise. Scand J Clin Lab Invest 24: 335-344, 1969.

Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. J Appl Physiol. 56(4):831-8. 1984

Hornero R, M. Aboy, D. Abasolo, J. McNames, B. Goldstein, Interpretation of approximate entropy: analysis of intracranial pressure approximate entropy during acute intracranial hypertension, IEEE Trans. Biomed. Eng. 52 (10) (2005) 1671-1680.

Hornero R, M. Aboy, D. Abasolo, J. McNames, W. Wakeland, B. Goldstein, Complex analysis of intracranial hypertension using approximate entropy, Crit. Care Med. 34 (1) (2006) 87-95.

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

Hwang GS, Tang L, Joung B, Morita N, Hayashi H, Karagueuzian HS, Weiss JN, Lin SF, Chen PS. Superiority of biphasic over monophasic defibrillation shocks is attributable to less intracellular calcium transient heterogeneity. J Am Coll Cardiol. 52(10):828-35, 2008.

Jalife J. Ventricular fibrillation: mechanisms of initiation and maintenance. Annu Rev Physiol. 62 : 25-50,2000.

- James D, Kraegen E and Chisholm D. Effects of exercise training on in vivo insulin action in individual tissues of the rat. *J Clin Invest* 76: 657-666, 1985.
- Kléber A and Rudy Y. Basic mechanism of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol rev* 84: 431-488, 2004.
- Knisley, S.B., Smith, W.M. & Ideker, R.E. 1992. Effect of field stimulation on cellular repolarization in rabbit myocardium: implications for reentry induction. *Circ Res* 70, 707-715.
- Konings KT, Smeets JL, Penn OC, Wellens HJ, Allessie MA. Configuration of unipolar atrial electrograms during electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation.*;95(5):1231-41. 1997
- Kroll MW, Swerdlow CD. Optimizing defibrillation waveforms for ICDs. *J Interv Card Electrophysiol. Review.*18(3):247-63,2007.
- Lamb DR. *Fisiología del Ejercicio. Respuestas y adaptaciones* 2º Ed. Augusto E. Pila Teleña. Madrid. 1989.
- Lee JJ, Kamjoo K, Hough D, Hwang C, Fan W, Fishbein MC, Bonometti C, Ikeda T, Karagueuzian HS and Chen PS. Reentrant wave fronts in Wiggers' stage II ventricular fibrillation. Characteristics and mechanisms of termination and spontaneous regeneration. *Circ Res* 78: 660-675, 1996.
- Lee JJ, Kamjoo K, Hough D, Hwang C, Fan W, Fishbein MC, Bonometti C, Ikeda T, Karagueuzian HS and Chen PS. Reentrant wave fronts in Wiggers' stage II ventricular fibrillation. Characteristics and mechanisms of termination and spontaneous regeneration. *Circ Res* 78: 660-675, 1996.
- Lewis M.J., Short A.L., Sample entropy of electrocardiographic RR and QT timeseries data during rest and exercise, *Physiol. Meas.* 28 (6) (2007) 731-744.
- Locke M, Tanguay RM. Increased HSF activation in muscles with a high constitutive Hsp70 expression. *Cell Stress Chaperones.* Sep;1(3):189-96. 1996
- López-Chicharro J i Fernández A. *Fisiología del ejercicio.* Ed Panamericana. Madrid. 2001.
- Maharaj T, Blake R, Trayanova N, Gavaghan D, Rodriguez B. The role of transmural ventricular heterogeneities in cardiac vulnerability to electric shocks. *Prog Biophys Mol Biol.* 96(1-3): 321-38. 2008.
- Mainardi L.T., Matteucci M., Sassi R., On predicting the spontaneous termination of atrial fibrillation episodes using linear and non-linear

parameters of ECG signal and RR series, Conf. Proc. IEEE Comput. Cardiol. 31 (2004) 665-668.

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

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

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

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

Oppenheim, Alan V.; Schafer, Ronald W. (1975). Digital signal processing. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall.

Paffenbarger RS, Hale WE. Work activity and coronary heart mortality. N Engl J Med. 1975 Mar 13;292(11):545-50.

Parra G, Díaz B, Such-Miquel L, Cebriá A, Pelechano F, Trapero I, Zarzoso M, Chorro, FJ, Such L, and Alberola AM. Effect of chronic physical exercise on myocardial heterogeneity and its modification by acute ischemia. XXXV CONGRESO SECF. Acta Physiologica, 195, Suppl 667, O04, 2009

Pattengale PK, Holloszy JO. Augmentation of skeletal muscle myoglobin by a program of treadmill running. Am J Physiol. 213(3) : 783-5, 1967.

Pelechano F., Such-Miquel L., Such L., López L., Salvador R.E., Chorro F.J., Trapero I., Cebriá A., Gómez P., Alberola A. El entrenamiento disminuye la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio ventricular. Estudio experimental en corazón aislado de conejo. Archivos de Medicina del Deporte. Vol. XXIV, nº 5, p. 366, 2007.

Pelechano F. Efectes electrofisiològics miocàrdics intrínsecs sobre l'automatisme. La conducció i la refractarietat produïts per la realització d'un protocol d'entrenament. Estudi experimental. Tesi doctoral 2008

- Pelliccia A, Maron BJ, Spataro A, Proschan MA and Spirito P. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *N Eng J Med* 324: 295-301, 1991.
- Pertsov AM, Davidenko JM, Salomonsz R, Baxter WT and Jalife J. Spiral waves of excitation underlie reentrant activity in isolated cardiac muscle. *Circ Res* 72: 631-650, 1993.
- Pincus, A.L. Goldberger, Physiological time-series analysis: what does regularity quantify? *Am. J. Physiol.* 266 (4 Pt 2) (1994) H1643–H1656.
- Pincus S.M., Approximate entropy as a measure of system complexity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (6) (1991) 2297–2301.
- Pincus S.M., Assessing serial irregularity and its implications for health, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2001) 245–267.
- Platasa M.M., S. Mazic, Z. Nestorovic, V. Gal, Complexity of heartbeat interval series in young healthy trained and untrained men, *Physiol. Meas.* 29 (4) (2008) 439–450.
- Platasa M.M., Gal V., Dependence of heart rate variability on heart period in disease and aging, *Physiol. Meas.* 27 (10) (2006) 989–998.
- Powers SK, Locke and M, Demirel HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc.* 33(3):386-92. 2001
- Proakis, J.G. and Manolakis, D.G.; *Digital Signal Processing*, Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 1996
- Rho RW, Page RL. Biphasic versus monophasic shock waveform for conversion of atrial fibrillation. *Card Electrophysiol.* 7(3) : 290-1, 2003.
- Richman J.S., Moorman J.R., Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 (6) (2000) H2039–H2049.
- Riviere D, Crampes F, Beauville M, Garrigues M. Lipolytic response of fat cells to catecholamines in sedentary and exercise-trained women. *J Appl Physiol.* 66(1) : 330-5, 1989.
- Rogers JM, Huang J, Smith WM and Ideker R.E. Incidence, evolution, and spatial distribution of functional reentry during ventricular fibrillation in pigs. *Circ Res* 84: 945-954, 1999.

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

Ryu K, Sahadevan J, Khrestian CM, Stambler BS, Waldo AL. Use of fast fourier transform analysis of atrial electrograms for rapid characterization of atrial activation-implications for delineating possible mechanisms of atrial tachyarrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 17(2):198-206 2006.

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

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

Schaible T and Scheuer J. Cardiac adaptations to chronic exercise. *Progress in cardiovascular diseases* 27: 297-324, 1985.

Schaible T and Scheuer J. Cardiac adaptations to chronic exercise. *Progress in cardiovascular diseases* 27: 297-324, 1985.

Scheuer J and Tipton, CM. Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann Rev Physiol* 39: 221-251, 1997.

Schuster, A. On the investigation of hidden periodicities with application to a supposed 26 day period of meteorological phenomena. *Terrestrial Magnetism and Atmospheric Electricity*, 3, 13-41, 1898.

Selkurt EE. Effect of acute pulmonary hypertension on pressure/flow in the canine pulmonary vascular bed. *Respir Physiol.* 60(2):169-80 1984.

Shin D.-G., Yoo C.-S., Yi S.-H., Bae J.-H., Kim Y.-J., Park J.-S., G.-R. Hong, Prediction of paroxysmal atrial fibrillation using nonlinear analysis of the R-R interval dynamics before the spontaneous onset of atrial fibrillation, *Circ. J.* 70 (1) 94-99 (2006).

Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 55(2):113-26. 2007

Strohmenger HU, Lindner KH and Brown CG. Analysis of the ventricular fibrillation ECG signal amplitude and frequency parameters as predictors of countershock success in humans. *Chest* 111: 584-89, 1997.

Strohmenger HU, Lindner KH and Brown CG. Analysis of the ventricular fibrillation ECG signal amplitude and frequency parameters as predictors of countershock success in humans. *Chest* 111: 584-89, 1997.

Such L, Alberola AM, Such-Miquel L, López L, Trapero I, Pelechano F, Gómez-Cabrera MC, Tormos A, Millet J, Chorro FJ. Effects of chronic exercise on myocardial refractoriness: a study on isolated rabbit heart. *Acta Physiol (Oxf)*. 193(4):331-9. 2008

Such L, Alberola A, Orts L, Such-Miquel L, Pelechano, Trapero I, Cebria A and Chorro FJ. Effects of chronic physical exercise on dominant frequency of ventricular fibrillation heterogeneity produced by acute coronary artery occlusion. A study in isolated rabbit heart. *European Heart Journal* 27: 99, 2006.

Such L, Rodríguez A, Alberola A, López L, Ruiz R, Artal L, Pons I, Pons ML, García C and Chorro FJ. Intrinsic changes on automatism, conduction, and refractoriness by exercise in isolated rabbit heart. *J Appl Physiol* 92: 225-229, 2002.

Such, L., Alberola, A.M., Such-Miquel, L., López, L., Trapero, I., Pelechano, F., Gómez-Cabrera, M.C., Tormos, A., Millet, J. & Chorro, F.J. 2008. Effects of chronic exercise on myocardial refractoriness: a study on isolated rabbit heart. *Acta Physiol* 193, 331-9.

Such-Miquel Luis M., Cebriá A., Díaz B., López L., Trapero I., Pelechano F., Parra G., Alberola A., Such L., Chorro F. J.. Effect of Physical training on intrinsic electrophysiological stability of ventricular myocardium. *ESC Congress 2008 European Heart Journal*, 29, Abstract Supplement, p. 532, 2008

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

Tipton CM, Matthes RD, Tchong T, Dowell RT and Vailas AC. The use of Langendorff preparation to study the bradycardia of training. *Med Sci Sports* 9: 220-230, 1977.

Tormos, A. Estudio experimental de los efectos de la hipotermia y la hipertermia local sobre los parámetros electrofisiológicos del miocardio y la frecuencia de activación de la fibrilación ventricular. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València. 2005.



Viitasalo MT, Kala R and Eisalo A. Ambulatory electrocardiographic findings in young athletes between 14-16 years of age. *Eur Heart J* 5: 2-6, 1984.

Viitasalo MT, Kala R and Eisalo A. Ambulatory electrocardiographic recording in endurance athletes. *Br Heart J* 47: 213-220, 1982.

W. Chen, J. Zhuang, W. Yu, Z. Wang, Measuring complexity using FuzzyEn, ApEn, and SampEn, *Med. Eng. Phys.* 31 (1) (2009) 61-68.

Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Qu Z and Chen PS. Chaos and the transition to ventricular fibrillation. A new approach to antiarrhythmic drug evaluation. *Circulation* 99: 2819-2826, 1999.

Welch, PD; The Use of Fast Fourier Transform for the Estimation of Power Spectra: A Method Based on Time Averaging Over Short, Modified Periodograms", *IEEE Transactions on Audio Electroacoustics*, Volume AU-15 (June 1967)

Witkowski FX, Leon LJ, Penkoske PA, Giles WR, Spano ML, Ditto WL and Winfree AT. Spatiotemporal evolution of ventricular fibrillation. *Nature* 392: 78-82, 1998.

Yu D, Small M, Harrison RG, Diks C. Efficient implementation of the Gaussian kernel algorithm in estimating invariants and noise level from noisy time series data, *Phys. Rev. E: Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscipl.* 61 (4A) : 3750-3756, 2000.

Zaitsev AV, Berenfeld O, Mironov SF, Jalife J, Pertsov AM. Distribution of excitation frequencies on the epicardial and endocardial surfaces of fibrillating ventricular wall of the sheep heart. *Circ Res* 6(4):408-17, 2000.

Zaitsev A, Guha P, Sarmast F, Kolli A, Berenfeld O, Pertsov A, Groot J, Coronel R and Jalife J. Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circ Res* 92: 546-553, 2003.

Zhou X, Ideker RE, Blitchington TF, Smith WM and Knisley SB. Optical transmembrane potential measurements during defibrillation-strength shocks in perfused rabbit hearts. *Circ Res* 77: 593-602, 1995.a