



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Ingeniería Electrónica

Tesis doctoral

**Estudio de los efectos electrofisiológicos de la
modificación local de la temperatura en un modelo
experimental de corazón aislado mediante un electrodo
específico de alta densidad con modulación térmica**

Presentada por:

Antonio Guill Ibáñez

Dirigida por los doctores:

Álvaro Tormos Ferrando,

José Millet Roig y

F. Javier Chorro Gascó.

Valencia, julio 2012

Resumen

La temperatura modula las propiedades electrofisiológicas del tejido cardíaco. El enfriamiento o calentamiento del miocardio en modelos animales se ha utilizado con distintos fines relacionados con la investigación de las arritmias cardíacas. Hasta el momento, las limitaciones en la metodología empleada no han posibilitado que las modificaciones térmicas de carácter regional en el epicardio fueran acompañadas de una cartografía eléctrica simultánea. Esta tesis pretende avanzar en este campo trabajando con modelos de corazón aislado y perfundido de conejo. Se ha desarrollado un dispositivo con el que posteriormente se ha realizado la investigación: un electrodo multipolar de alta resolución con capacidad de modificar la temperatura epicárdica en la zona de registro. Se han determinado sus características técnicas y funcionales más relevantes. Se ha aplicado un protocolo experimental encaminado al estudio del efecto modulador de la temperatura sobre determinados parámetros electrofisiológicos. Se ha estudiado: el intervalo QT en ritmo sinusal, la aparición de respuestas repetitivas (despolarizaciones espontáneas) y la inducción de FV en condiciones de estimulación programada, y una vez instaurada la FV: la velocidad de conducción, la longitud de onda, la refractariedad ventricular, la complejidad de los mapas de activación epicárdica ventricular y la reversión de la arritmia mediante enfriamiento selectivo y gradual epicárdico. Los resultados muestran la viabilidad del dispositivo para este tipo de investigaciones. Ello ha posibilitado la inducción de heterogeneidades en la activación eléctrica del tejido: en ritmo sinusal el intervalo QT se prolongó con la hipotermia local y se redujo con la hipertermia; en condiciones de FV, la velocidad de conducción se enlenteció

con el frío y se aceleró con el calor, los cambios de temperatura modularon la longitud de onda, el intervalo fibrilatorio (longitud media del ciclo fibrilatorio) y la refractariedad –estimada a partir del percentil 5 del intervalo fibrilatorio. Hubo cambios en los patrones de activación con la temperatura, y aumentó la complejidad de los mapas de activación en hipotermia. En condiciones de estimulación programada, no se halló asociación entre la presencia de respuestas repetitivas y las heterogeneidades inducidas, éstas últimas tampoco facilitaron la inducción de FV. Finalmente, se comprobó que la aplicación de enfriamiento epicárdico selectivo y progresivo en el modelo de corazón perfundido empleado, no fue suficiente para revertir la FV.

Resum

La temperatura modula les propietats electrofisiològiques del teixit cardíac. El refredament o escalfament del miocardi en models animals s'ha utilitzat amb diferents finalitats relacionades amb la investigació de les arítmies cardíques. Fins ara, les limitacions en la metodologia emprada no han possibilitat que les modificacions tèrmiques de caràcter regional en l'epicardi fossin acompanyades d'una cartografia elèctrica simultània. Aquesta tesi pretén avançar en aquest camp treballant amb models de cor aïllat i perfós de conill. S'ha desenvolupat un dispositiu amb el qual posteriorment s'ha realitzat la investigació: un elèctrode multipolar d'alta resolució amb capacitat de modificar la temperatura epicàrdica a la zona de registre. S'han determinat les seves característiques tècniques i funcionals més rellevants. S'ha aplicat un protocol experimental encaminat a l'estudi de l'efecte modulador de la temperatura sobre determinats paràmetres electrofisiològics. S'ha estudiat: l'interval QT en ritme sinusal, l'aparició de respostes repetitives (despolaritzacions espontànies) i la inducció de FV en condicions d'estimulació programada, i un cop instaurada la FV: la velocitat de conducció, la longitud d'ona, la refractarietat ventricular, la complexitat dels mapes d'activació epicàrdica ventricular i la reversió de l'arítmia mitjançant refredament selectiu i gradual epicàrdic. Els resultats mostren la viabilitat del dispositiu per a aquest tipus d'investigacions. Això ha possibilitat la inducció de heterogeneïtats en l'activació elèctrica del teixit: en ritme sinusal l'interval QT es va allargar amb la hipotèrmia local i es va reduir amb la hipertèrmia, en condicions de FV, la velocitat de conducció es va alentir amb el fred i es va accelerar amb la calor, els canvis de temperatura van modular la longitud d'ona, l'interval fibrilatori (longitud mitjana del cicle fibrilatori) i la

refractarietat –estimada a partir del percentil 5 de l'interval fibrilatori. Hi va haver canvis en els patrons d'activació deguts a la temperatura, i va augmentar la complexitat dels mapes d'activació en hipotèrmia. En condicions d'estimulació programada, no es va trobar associació entre la presència de respostes repetitives i les heterogeneïtats induïdes, aquestes últimes tampoc van facilitar la inducció de FV. Finalment, es va comprovar que l'aplicació de refredament epicàrdic selectiu i progressiu en el model de cor perfós empleat, no va ser suficient per revertir la FV.

Abstract

Temperature modulates the electrophysiological properties of cardiac tissue. The cooling or warming of the myocardium in animal models has been used for various purposes related to research in cardiac arrhythmias. So far, limitations in the methodology did not allow the simultaneous regional modification of temperature in the epicardium together with electrical mapping. This thesis aims to advance the field of the evaluation of the electrophysiological changes induced by temperature in models of isolated and perfused rabbit heart. We have developed a device that includes a high resolution multi-polar electrode capable of modifying epicardial temperature in the recording area. Later, we have determined their most relevant functional and technical features. We have applied an experimental protocol aimed to study the modulating effect of temperature on several electrophysiological parameters. Were studied: the QT interval in sinus rhythm, the onset of repetitive responses (spontaneous depolarizations) and ventricular fibrillation (VF) induction under programmed stimulation, and during VF: the conduction velocity, the wavelength of ventricular refractoriness, the complexity of epicardial activation maps and termination of VF by selective and gradual epicardial cooling. The results show the feasibility of the use of this device for this type of research. This has enabled the induction of heterogeneities in the electrical activation of the tissue: in sinus rhythm the QT interval was prolonged by local hypothermia and reduced by hyperthermia. During VF, cooling reduced conduction velocity whereas warming the tissue increased conduction velocity. Temperature changes modulated the VF wavelength, the fibrillatory interval (mean fibrillatory cycle length) and refractoriness-estimated as the 5th percentile of

the fibrillatory interval. There were changes in activation patterns due to temperature, increasing the complexity of the activation maps in hypothermia. Under conditions of programmed stimulation, no association was found between the presence of repetitive responses and the induced heterogeneities, which did not facilitate the induction of VF. Finally, we found that epicardial application of selective and progressive cooling in the perfused heart model used, was not sufficient to terminate VF.

Dedicatòria

És curiós que coses tan simples i a la vegada difícils d'explicar siguin les que donen sentit a la vida.

A Núria i els xiquets, per entendre i consentir les meves absències durant tant de temps, conscient d'haver perdut moments que no tornaran...

Als meus pares per creure en mi.

L'home s'eleva per la intel·ligència, però no és home més que pel cor.

Henri-Frédéric Amiel

Índice general

Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Bases sobre electrofisiología cardíaca.....	5
1.1.1 Anatomía y ciclo cardíaco.....	5
1.1.2 Origen y propagación de la excitación cardíaca.....	7
1.1.3 El electrograma	11
1.1.4 Detección de la activación.....	14
1.1.5 Morfología del EGM unipolar.....	15
1.1.6 Influencia de la temperatura sobre la función cardíaca.....	18
1.1.7 Electrofisiología experimental y temperatura	18
1.2 Fibrilación ventricular. Generalidades	19
1.2.1 Descripción de la FV	20
1.2.2 Perspectiva histórica de la investigación en FV	22
1.2.3 Aplicaciones clínicas de los estudios sobre la FV.....	26
1.3 Mecanismos de las arritmias. La reentrada	27
1.4 Teorías sobre la FV	30
1.4.1 Teoría de las ondas múltiples de Moe	31
1.4.2 Teoría del rotor madre.....	32
1.4.3 Hipótesis de la rotura de rotores y la restitución	35
1.4.4 Estado Actual	38
1.5 Aproximaciones metodológicas al estudio de la electrofisiología cardíaca.....	39
1.5.1 Estudios basados en trabajos experimentales.....	39

1.5.2 Preparaciones de origen animal. Legislación	41
1.5.3 Experimentación con corazón aislado y perfundido	42
1.5.4 Análisis de las características del ECG	44
1.5.5 Registros intracelulares	45
1.5.6 Técnicas electro-cartográficas (.....	46
1.5.7 Estudios basados en simulaciones mediante ordenador	54
1.6 Influencia de la temperatura	57
1.6.1 Efectos a nivel celular	57
1.6.2 Arritmogenicidad asociada a la hipotermia/hipertermia	59
1.6.3 Consecuencias en FV	62
1.6.4 Contexto actual y posibles aportaciones	64
1.7 Desarrollo de dispositivos ad hoc.....	66
1.7.1 Justificación de la necesidad	66
1.7.2 Aspectos a considerar	67
1.7.3 Experiencias previas realizadas.....	69
1.7.4 Soluciones alternativas	70
1.8 Parámetros electrofisiológicos a analizar	71
1.8.1 Arritmogenicidad. Intervalo QT en ritmo sinusal	72
1.8.2 Inducibilidad de la FV en estimulación programada.	
Determinación de respuestas repetitivas	72
1.8.3 Velocidad de conducción en FV	73
1.8.4 Refractariedad y longitud de onda en FV.....	74
1.8.5 Patrones de activación en FV. Complejidad de los mapas de activación	75

1.8.6 Reversión de la FV	76
1.8.7 Esbozo de protocolos experimentales	77
Capítulo 2. Objetivos.....	79
2.1 Justificación de la investigación.....	83
2.2 Hipótesis.....	84
2.3 Objetivos de la investigación	85
2.4 Metodología	86
2.5 Plan de trabajo.....	87
2.6 Recursos	88
Capítulo 3. Desarrollo del dispositivo electrodo.....	91
3.1 Condicionantes y requisitos a satisfacer.....	95
3.2 Sistema térmico	97
3.2.1 Célula Peltier	97
3.2.2 Elementos refrigerantes.....	99
3.3 Electrodo	99
3.3.1 Concepción.....	101
3.3.2 Conexionado.....	103
3.3.3 Realización	105
3.3.4 Comprobación funcional	106
3.4 Caracterización del dispositivo desarrollado.....	106
3.4.1 Protocolo experimental	106
3.4.2 Comportamiento dinámico de las variaciones térmicas	107
3.4.3 Profundidad de actuación epicárdica.....	108

3.4.4 Distribución de temperatura epicárdica.....	109
Capítulo 4. Material y métodos	111
4.1 Entorno experimental	115
4.1.1 Preparación experimental	116
4.1.2 Elementos de registro y estimulación. Ubicación	117
4.1.3 Instrumentación	121
4.1.4 Software	124
4.2 Parámetros electrofisiológicos analizados	125
4.2.1 Intervalo QT	126
4.2.2 Respuestas repetitivas e inducción de FV	127
4.2.3 Parámetros en fibrilación ventricular. Clasificación de mapas de activación.....	131
4.3 Cálculos estadísticos	137
4.4 Protocolo experimental	137
4.4.1 Primera parte: ritmo sinusal y estimulación programada....	138
4.4.2 Segunda parte: fibrilación ventricular	140
4.5 Otros experimentos complementarios	140
4.5.1 Desarrollo y aplicación de dispositivos enfriadores.....	141
4.5.2 Enfriamiento por inmersión progresiva de la preparación ..	143
Capítulo 5. Resultados.....	145
5.1 Características del dispositivo diseñado.....	149
5.1.1 Comportamiento estático de las variaciones térmicas.....	149
5.1.2 Comportamiento dinámico de las variaciones térmicas	152

5.1.3 Alcance de las variaciones térmicas en la pared ventricular	153
5.1.4 Distribución térmica epicárdica	153
5.2 Intervalo QT en ritmo sinusal.....	154
5.3 Estimulación programada. Inducibilidad de la FV.....	156
5.3.1 Determinación de las respuestas repetitivas	156
5.3.2 Inducción de FV	157
5.4 Parámetros electrofisiológicos en FV	157
5.4.1 Intervalo VV de la FV	158
5.4.2 Indicador de refractariedad.....	160
5.4.3 Velocidad de conducción en FV	164
5.4.4 Longitud de onda en FV	165
5.4.5 Complejidad de la activación	166
5.5 Exploración de la reversión de la FV	169
5.5.1 Aplicación de dispositivos enfriadores	169
5.5.2 Enfriamiento por inmersión progresiva.....	169
Capítulo 6. Discusión.....	171
6.1 Comentarios sobre la metodología empleada.....	175
6.1.1 Preparación de corazón aislado de conejo.....	175
6.1.2 Sobre el planteamiento metodológico general	177
6.2 Evaluación del dispositivo desarrollado.....	178
6.2.1 Comportamiento estático de las variaciones térmicas.....	179
6.2.2 Comportamiento dinámico de las variaciones térmicas	179
6.2.3 Alcance de las variaciones térmicas en la pared ventricular	180
6.2.4 Distribución térmica epicárdica	182

6.2.5 Calidad de los registros obtenidos.....	183
6.2.6 Aspectos constructivos	184
6.3 Efectos de las modificaciones locales de temperatura	185
6.3.1 Variación del intervalo QT.....	185
6.3.2 Aparición de respuestas repetitivas	187
6.3.3 Variación en la velocidad de conducción en FV	188
6.3.4 Modificación en el intervalo VV, refractariedad y longitud de onda en FV	189
6.3.5 Afectación en los patrones de activación en FV	193
6.3.6 Reversión de la FV mediante enfriamiento	195
6.4 Limitaciones del estudio.....	196
6.5 Futuras líneas de trabajo.....	197
Capítulo 7. Conclusiones	201
Capítulo 8. Bibliografía	207
Capítulo 9. Publicaciones	249
9.1 Participación en congresos internacionales.....	253
9.2 Participación en congresos de ámbito estatal.....	254
9.3 Publicación de artículos en revista	255

Abreviaturas

- APD — duración del potencial de acción
- ECG — señal del electrocardiograma
- EGM — señal del electrograma
- EP — estimulación programada
- FA — fibrilación auricular
- FrD — frecuencia dominante de la señal de FV
- FV — fibrilación ventricular
- LO — longitud de onda del proceso de activación
- n.s. — no significativo
- p.e. — por ejemplo
- PA — potencial de acción miocárdico
- Pct5 — percentil 5 del histograma de VV
- PRE — período refractario efectivo
- PRF — período refractario funcional
- QT — intervalo QT en el electrograma
- RR — respuestas repetitivas
- RS — ritmo sinusal
- T — temperatura epicárdica local
- TV — taquicardia ventricular
- VC — velocidad de conducción del proceso de activación
- VV — intervalo de activación o intervalo fibrilatorio
- ZM — zona donde se efectúan las modificaciones térmicas
- ZN — zona no sujeta a modificaciones térmicas

Capítulo 1. **Introducción**

En la investigación realizada durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han analizado las señales eléctricas obtenidas en la superficie del epicardio ventricular en modelos de corazón aislado de conejo, al que se ha sometido a modificaciones localizadas de temperatura. El propósito ha sido el de contribuir al avance en el conocimiento de los mecanismos implicados en la fibrilación ventricular (FV) –arritmia letal principal causa de muerte súbita en países industrializados. En el estudio se han determinado diversos parámetros electrofisiológicos obtenidos a diferentes temperaturas, en condiciones de ritmo sinusal, bajo estimulación programada y en FV.

En los primeros apartados de este capítulo se realiza una pequeña introducción a la fisiología básica del corazón, con especial atención al origen y propagación normal de la excitación cardíaca, a las características de la señal del electrograma, una sucinta descripción a modo de presentación preliminar de los parámetros que se analizarán y unos comentarios sobre la electrofisiología experimental y la temperatura como elemento modulador. Posteriormente, se describe el fenómeno de la FV, sus manifestaciones en el electrograma unipolar y sus implicaciones clínicas, desarrollando asimismo una breve perspectiva histórica sobre su estudio. A continuación, se resume el papel de la reentrada en los mecanismos de generación y mantenimiento de la FV, y se detallan las aportaciones más importantes que los investigadores han realizado sobre esta arritmia, agrupadas según la técnica

de estudio. El apartado siguiente intenta resumir la complejidad del problema exponiendo agrupadamente las principales teorías sobre la FV que actualmente son objeto de controversia e investigación. Se prosigue con la presentación de las metodologías experimentales empleadas en el campo de la electrofisiología cardíaca, se describe el sistema de Langendorff y la experimentación con modelos animales, incluyendo sus implicaciones legales. Se expone también el análisis de las características del ECG, los registros intracelulares, los estudios basados en ordenador, y las técnicas de registro electro-cartográficas. Le sucede el análisis del papel que se atribuye a la temperatura en las propiedades electrofisiológicas del corazón, así como el estado actual del conocimiento sobre los efectos de la hipotermia y la hipertermia, global y local, en los procesos fibrilatorios. Se continúa con el desarrollo de dispositivos ad hoc adaptados a la investigación, su necesidad, los aspectos a considerar, las experiencias previas realizadas y un planteamiento alternativo que dé respuesta a limitaciones anteriores. Finalmente se presentan los parámetros electrofisiológicos cuyo análisis se considera oportuno, así como un esbozo del protocolo experimental general a realizar.

A lo largo de este capítulo, se argumenta –en base a una recopilación estructurada de conocimientos extraídos de la literatura científica– y se remarca de forma reiterada y sistemática el interés de aquellos aspectos relacionados con la presente investigación, tanto en su planteamiento general como aquellos más concretos. Todo ello dará pie a que en el siguiente capítulo se justifique la realización de la investigación y se planteen la hipótesis, objetivos y plan de trabajo para llevarla a término.

Índice del capítulo

1.1 Bases sobre electrofisiología cardíaca.....	5
1.1.1 Anatomía y ciclo cardíaco.....	5
1.1.2 Origen y propagación de la excitación cardíaca.....	7
1.1.3 El electrograma	11
1.1.4 Detección de la activación.....	14
1.1.5 Morfología del EGM unipolar.....	15
1.1.6 Influencia de la temperatura sobre la función cardíaca.....	18
1.1.7 Electrofisiología experimental y temperatura	18
1.2 Fibrilación ventricular. Generalidades	19
1.2.1 Descripción de la FV.....	20
1.2.2 Perspectiva histórica de la investigación en FV.....	22
1.2.3 Aplicaciones clínicas de los estudios sobre la FV.....	26
1.3 Mecanismos de las arritmias. La reentrada	27
1.4 Teorías sobre la FV	30
1.4.1 Teoría de las ondas múltiples de Moe.....	31
1.4.2 Teoría del rotor madre.....	32
1.4.3 Hipótesis de la rotura de rotores y la restitución.....	35
1.4.4 Estado Actual	38
1.5 Aproximaciones metodológicas al estudio de la electrofisiología cardíaca.....	39
1.5.1 Estudios basados en trabajos experimentales.....	39
1.5.2 Preparaciones de origen animal. Legislación	41
1.5.3 Experimentación con corazón aislado y perfundido	42

1.5.4 Análisis de las características del ECG	44
1.5.5 Registros intracelulares	45
1.5.6 Técnicas electro-cartográficas (.....	46
1.5.7 Estudios basados en simulaciones mediante ordenador	54
1.6 Influencia de la temperatura	57
1.6.1 Efectos a nivel celular	57
1.6.2 Arritmogenicidad asociada a la hipotermia/hipertermia	59
1.6.3 Consecuencias en FV	62
1.6.4 Contexto actual y posibles aportaciones	64
1.7 Desarrollo de dispositivos ad hoc.....	66
1.7.1 Justificación de la necesidad	66
1.7.2 Aspectos a considerar	67
1.7.3 Experiencias previas realizadas.....	69
1.7.4 Soluciones alternativas	70
1.8 Parámetros electrofisiológicos a analizar	71
1.8.1 Arritmogenicidad. Intervalo QT en ritmo sinusal	72
1.8.2 Inducibilidad de la FV en estimulación programada. Determinación de respuestas repetitivas	72
1.8.3 Velocidad de conducción en FV	73
1.8.4 Refractariedad y longitud de onda en FV.....	74
1.8.5 Patrones de activación en FV. Complejidad de los mapas de activación	75
1.8.6 Reversión de la FV	76
1.8.7 Esbozo de protocolos experimentales	77

1.1 Bases sobre electrofisiología cardíaca

El corazón es uno de los órganos necesarios para la sustentación de la vida. Su misión es el bombeo de sangre a todas las partes del cuerpo gracias a la acción combinada de sus cuatro cámaras. La contracción y distensión de dichas cámaras se realiza de manera rítmica y organizada, de forma que se optimiza el gasto cardíaco [Guyton 1956].

1.1.1 Anatomía y ciclo cardíaco

La *Figura 1.1* muestra la configuración anatómica del corazón, que puede considerarse como una bomba biológica de tipo pulsátil que mantiene el flujo sanguíneo circulando por las "tuberías" del organismo a la presión y caudal necesarios. Este órgano se compone de cuatro cámaras (dos superiores o aurículas y dos inferiores o ventrículos) comunicadas dos a dos por las válvulas aurículo-ventriculares o válvulas AV (tricúspide y mitral). Los ventrículos están a su vez separados de las arterias aorta y pulmonar por sendas válvulas.

La sangre fluye ininterrumpidamente hacia las aurículas a través de las venas cavas y pulmonares, y sale del corazón por las arterias aorta y pulmonar; es lo que se conoce como sistema cardiovascular.

El corazón es básicamente un músculo, el miocardio, compuesto por células excitables que se contraen al ser estimuladas por sus vecinas [Webster 1992]. Esta característica del miocardio –la conducción eléctrica similar a la de las neuronas en los nervios– no la tiene ningún otro tipo de tejido muscular del resto del cuerpo.

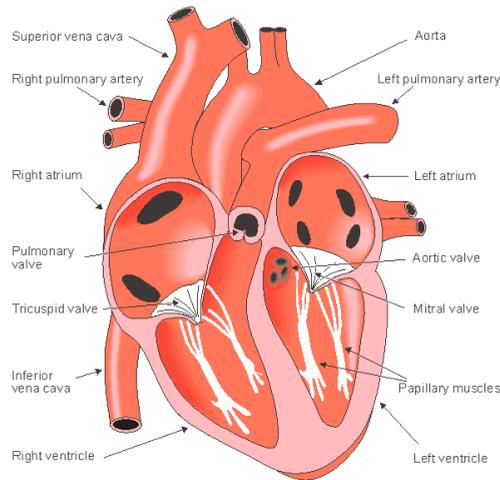


Figura 1.1 Anatomía del corazón [obtenido de Malmivuo and Plonsey 1995]

Las paredes interiores constituyen el endocardio, mientras que la exterior recibe el nombre de epicardio. El septum es el tabique que separa los ventrículos. Un sistema de fibras especializadas y poco contráctiles distribuyen apropiadamente los impulsos eléctricos responsables de la contracción sincronizada del músculo cardíaco, dando lugar al ciclo cardíaco.

El ciclo cardíaco empieza con la diástole. Durante la diástole ventricular las válvulas AV se abren, fluyendo la sangre hacia los ventrículos por la diferencia de presión existente.

La última fase de la diástole es la sístole auricular, en que las aurículas se contraen para acabar de llenar los ventrículos. La sístole ventricular comienza con el cierre de las válvulas AV y la contracción isométrica de los ventrículos. La presión aumenta hasta abrir las válvulas aórtica y pulmonar, vaciando así las cámaras ventriculares. Estas válvulas se

cierran con la relajación ventricular que llega a continuación, provocando ésta que se abran de nuevo las válvulas AV, completando así el ciclo.

1.1.2 Origen y propagación de la excitación cardíaca

El miocardio es un tejido excitable capaz de conducir los impulsos eléctricos a través de un sistema propio de conducción con objeto de provocar su contracción y la consiguiente aparición de una fuerza opuesta a la resistencia vascular. Dichos impulsos los genera el corazón de forma intrínseca, aunque vienen modulados por factores extrínsecos como la inervación vegetativa, hormonas, iones, temperatura; es el automatismo cardíaco.

Las estructuras que constituyen el sistema de conducción eléctrica en el corazón son: el nodo sinusal o sinoauricular (nodo SA), las vías auriculares internodales, el nodo aurículo-ventricular (nodo AV), el haz de His con sus ramas y las fibras de Purkinje (*Figura 1.2*).

En condiciones normales, los impulsos que inician el ciclo cardíaco se originan en el nodo SA, que puede considerarse el marcapasos natural del corazón. Este nodo es una región de aproximadamente 3 mm de ancho y 1.5 cm de largo situada en la parte anterosuperior de la aurícula derecha. El tejido del nodo SA se caracteriza por ser autoexcitable, esto es, que tras cada potencial de acción¹ (PA) no se alcanza un potencial de reposo sino que, sin necesidad de ningún estímulo externo, el potencial comienza a recuperarse de forma lineal hasta alcanzar de nuevo el umbral de disparo y generar otro potencial de acción. Este fenómeno se produce a un ritmo aproximado de un

¹ Cuando las membranas de ciertas células excitables son despolarizadas por un estímulo superior a un umbral, el potencial intracelular sufre un cambio brusco y se hace transitoriamente positivo para retornar a continuación al nivel de reposo. Este cambio se denomina potencial de acción

ciclo por segundo, aunque su frecuencia exacta la regula el sistema neurovegetativo de acuerdo con las necesidades del organismo en cada instante.

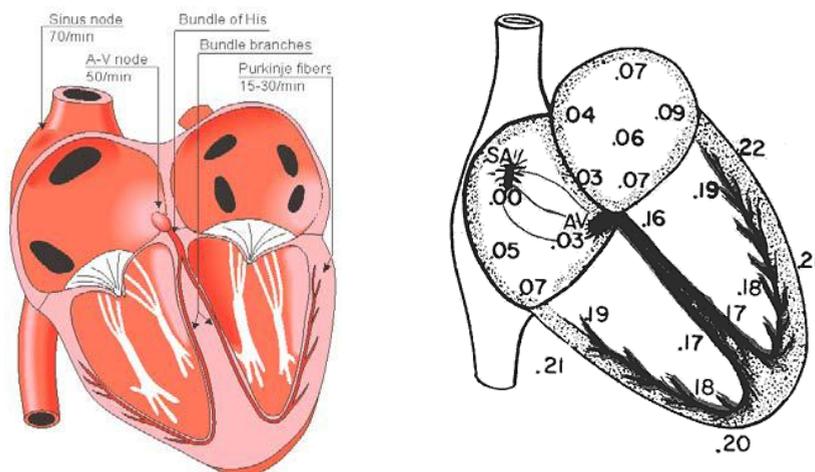


Figura 1.2 Conducción eléctrica del corazón. Izquierda: partes de este sistema. Derecha: avance de la onda de despolarización, en fracciones de segundo [obtenido de Malmivuo and Plonsey 1995]

El potencial de acción generado en el nodo SA se propaga a las fibras musculares auriculares vecinas. Debido a la estructura del tejido, el impulso se extiende a todo el miocardio auricular, que se contrae a su paso (sístole auricular). Sin embargo, el miocardio ventricular está eléctricamente separado del auricular por un tejido fibroso que impide la propagación de los impulsos, de forma que la contracción de las aurículas no tiene una continuidad inmediata con la de los ventrículos; es necesario que el potencial de acción llegue por otro camino a éstos últimos. Tomando como partida el nodo SA se conducen los impulsos hasta el nodo AV a través de las vías internodales. En el nodo AV la señal eléctrica es conducida a muy baja

velocidad con el fin de introducir un retardo que produzca el retraso temporal necesario entre la contracción de las aurículas y la de los ventrículos. La salida del nodo AV conecta con el haz aurículo-ventricular o de His. Este haz se divide en dos ramas que discurren por la pared que separa los ventrículos. Ambas ramas terminan ramificándose a su vez en el sistema de fibras de Purkinje. Las fibras de Purkinje están conectadas a las fibras del miocardio y se caracterizan por tener una velocidad de conducción muy alta. De este modo se garantiza que el impulso se transmitirá de forma casi simultánea a todos los puntos de los ventrículos para conseguir una contracción uniforme y eficaz.

Hay que resaltar que todas las células poseen un período refractario, esto es, un intervalo de tiempo durante el cual la célula que ha soportado un potencial de acción queda insensible a nuevos estímulos, es decir transitoriamente durante ese intervalo pierde la excitabilidad. Gracias a ello, el frente de onda que propaga el impulso a través del miocardio avanza sólo hacia adelante (*Figura 1.2*), sin que las células que van siendo excitadas puedan a su vez reexcitar a las que les precedían y crear de esa forma un sistema de oscilación realimentado.

El ciclo anteriormente descrito es el que controla la contracción sincrónica de aurículas y ventrículos, y la actividad eléctrica generada puede ser registrada mediante el electrocardiograma de superficie (ECG). La *Figura 1.3* muestra los potenciales de acción en las diferentes células especializadas del sistema de conducción del corazón, y su relación temporal con la señal superficial del ECG (la latencia corresponde aproximadamente a la habitual en un corazón humano).

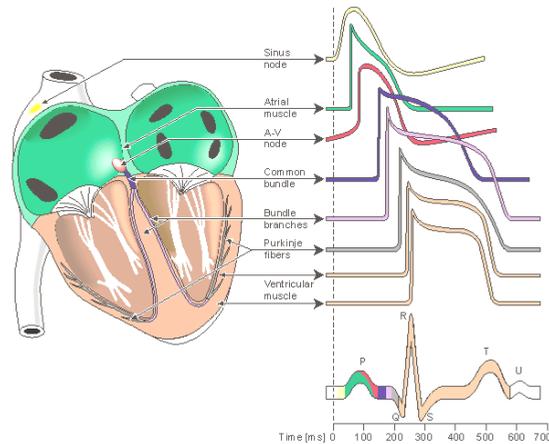


Figura 1.3 Electrofisiología del corazón. Potenciales de acción en las diferentes células especializadas del sistema de conducción del corazón y señal del ECG conformada [obtenido de Malmivuo and Plonsey 1995]

El ECG es uno de los registros extracelulares que mayor información contiene acerca del funcionamiento de un órgano vital del organismo, su importancia para el diagnóstico clínico es esencial desde que en 1903 el holandés W. Einthoven lo registrara por primera vez utilizando un galvanómetro. En la *Figura 1.4* se muestra un electrocardiograma convencional real obtenido mediante una derivación estándar II [Webster 1992]. Al igual que en la *Figura 1.3*, pueden diferenciarse claramente las principales ondas constitutivas de un ECG (onda P, complejo QRS y onda T). La onda P se corresponde con la despolarización (contracción) de las aurículas, el complejo QRS con la despolarización de los ventrículos y la onda T con la repolarización de los ventrículos. La repolarización auricular queda enmascarada por el complejo QRS.

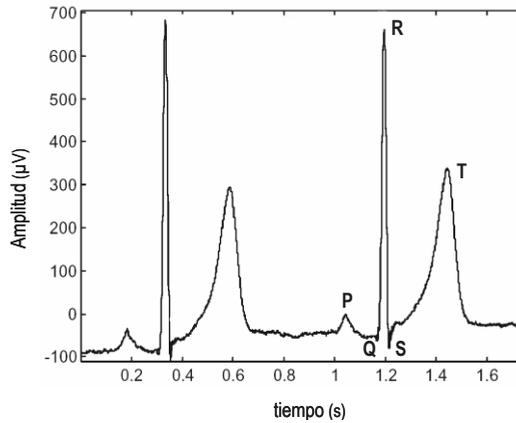


Figura 1.4 Señal del electrocardiograma con indicación de las ondas constitutivas [obtenido de Millet 1997]

1.1.3 El electrograma

Cuando los potenciales de acción están tomados directamente sobre el miocardio, los registros obtenidos se denominan electrogramas, reconociéndose de forma abreviada como EGM. Al igual que ocurre con el ECG, el EGM puede registrarse de forma unipolar o bipolar, aunque en este caso con connotaciones distintas. Así, cuando la señal es amplificada en modo "*single-ended*" —es decir, un electrodo en contacto directo con el miocardio y un terminal de referencia más lejano— se reconoce como registro unipolar; si se amplifica en modo diferencial —esto es, un electrodo dual con las puntas de contacto muy cercanas amplificando la diferencia entre ambos— se reconoce como registro bipolar.

Descripción

El campo eléctrico producido en la zona situada entre el miocardio en reposo y el miocardio excitado puede ser descrito como un dipolo. Durante la excitación cardíaca, la aproximación de este dipolo hacia un electrodo explorador da una deflexión positiva que pasa posteriormente a una deflexión negativa para regresar finalmente a la línea base. La repolarización causa también un dipolo, aunque de polaridad contraria.

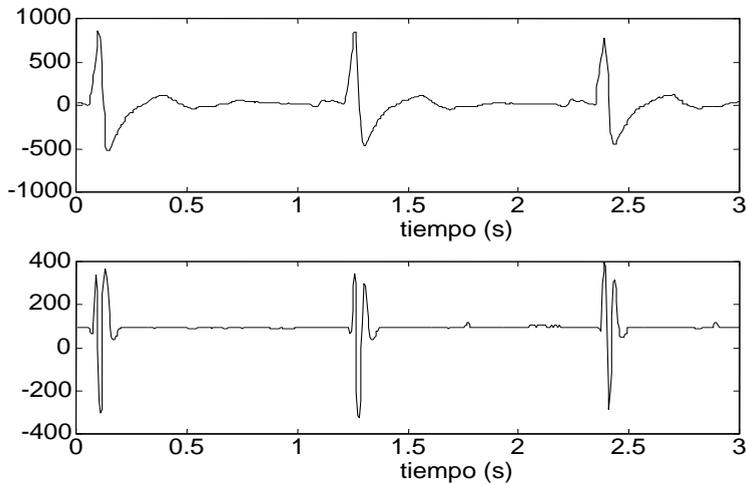


Figura 1.5 EGM unipolar y bipolar (registros clínicos obtenidos de un ICD). Arriba: extracto de ritmo sinusal para un electrograma unipolar. Abajo: el mismo extracto, correspondiente al electrograma bipolar [obtenido de Millet 1997]

La amplitud del electrograma unipolar es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la distancia entre el dipolo y el punto de adquisición. Por tanto, los electrogramas unipolares contienen una combinación de eventos eléctricos locales y distantes, siendo la contribución de éstos últimos (eventos distantes) decreciente proporcionalmente a la raíz cuadrada de la

distancia al electrodo explorador. Todos los electrogramas analizados durante este trabajo fueron registrados de forma unipolar.

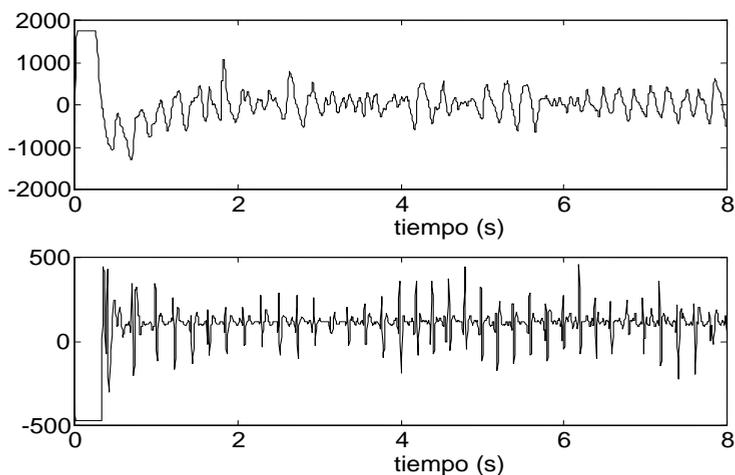


Figura 1.6 EGM unipolar y bipolar (registros clínicos obtenidos de un ICD). Arriba: extracto de fibrilación ventricular para un electrograma unipolar. Abajo: el mismo extracto, correspondiente al electrograma bipolar [obtenido de Millet 1997]

El electrograma bipolar se registra como la diferencia entre dos electrodos próximos en contacto directo con el corazón, por tanto se puede asumir que se corresponde con la diferencia entre dos electrogramas unipolares en cada uno de los puntos donde se sitúan los electrodos. Estos dos electrogramas unipolares difieren únicamente en la actividad local en el momento de la excitación. En el caso de que se produzca un pico en el electrograma bipolar, su amplitud es inversamente proporcional a la tercera potencia de la distancia entre el punto de adquisición y el dipolo. Si la dirección del frente de activación es paralela en relación al par de electrodos, el pico bipolar será de amplitud máxima.

La *Figura 1.5* muestra un ejemplo de un segmento de EGM unipolar y otro bipolar, registrados durante el ritmo sinusal por un desfibrilador implantable o ICD (*internal cardioverter defibrillator*). De la misma manera, la *Figura 1.6* corresponde a un episodio de fibrilación ventricular.

1.1.4 Detección de la activación

En el análisis del EGM juega un papel primordial la detección de los instantes de activación, o momentos en los que se produce la despolarización del miocardio en el punto de registro de la señal. Esto es necesario, por ejemplo, en las técnicas cartográficas ("*mapping*"), en donde, a partir de un registro multipunto del electrograma, se pretende construir mapas de activación en los que se pueda observar el recorrido espacial o avance de la onda (u ondas) de despolarización del miocardio. Es la dinámica de activación o frente de onda. En los registros unipolares prácticamente todas las técnicas de obtención automática de estos instantes de activación están basadas en la búsqueda de la máxima pendiente negativa [Shenasa et al. 1996]. Las reglas fundamentales son dos:

1. Búsqueda en cada electrograma de los puntos en que la pendiente negativa supera un umbral predefinido. Estos puntos se aceptan como posibles puntos de activación.
2. Si dos o más instantes de tiempo cumplen el criterio dentro de una ventana predefinida, el instante con mayor pendiente será el elegido como tiempo de activación local.

Los distintos algoritmos existentes varían básicamente en el criterio de elección para el valor umbral, el ancho de la ventana y la forma en que la pendiente del electrograma es calculada (algoritmos de 2 puntos, 3 puntos ó

5 puntos). Algunos además tienen en cuenta un período refractario después de cada instante de tiempo en el que se detectó una activación. Otros usan un umbral para la pendiente en relación con las pendientes medidas en cada electrograma analizado.

La principal controversia en algoritmos unipolares es la elección del valor óptimo del umbral de la pendiente. El problema básico consiste en distinguir la actividad local (pendiente negativa elevada) de la actividad distante sin actividad local (asociado con una pendiente menor).

En esta investigación tiene especial importancia la detección de los instantes de activación en FV, principalmente en la obtención de los intervalos entre activaciones consecutivas –intervalo fibrilatorio o intervalo VV– y necesarios también para la obtención de los patrones de activación, de los que se determina la complejidad de los mapas de activación. En ese sentido, para facilitar el trabajo se considera conveniente el empleo de aplicaciones basadas en algoritmos que permitan la identificación de activaciones miocárdicas locales con deflexiones negativas bruscas y de suficiente amplitud en el electrograma y que conservan continuidad espacio-temporal con las vecinas, como la desarrollada por nuestro grupo de investigación [Ibáñez-Català et al. 2009].

1.1.5 Morfología del EGM unipolar

En la morfología de los electrogramas unipolares se codifica gran parte de la actividad del corazón, lo que permite llegar a importantes conclusiones en diferentes condiciones patológicas y fisiológicas, mientras que la morfología de complejos bipolares puede contener información valiosa sobre patrones de activación local.

El electrograma ventricular, de forma genérica, está compuesto por la contribución de dos tipos de eventos, por una parte se tiene los eventos eléctricos de campo cercano y por otra los eventos eléctricos de campo lejano [Warren et al. 1996]:

- Eventos eléctricos de campo cercano: son las contribuciones al electrograma por parte de la despolarización y repolarización ventricular. En el entorno de los dispositivos implantables se denomina “onda R” a la zona de la señal correspondiente a la despolarización y “onda T” a la repolarización (*Figura 1.7*).
- Eventos eléctricos de campo lejano: son las contribuciones al electrograma por parte de la despolarización y repolarización auricular. A la despolarización de la aurícula se le llama comúnmente “onda P”.

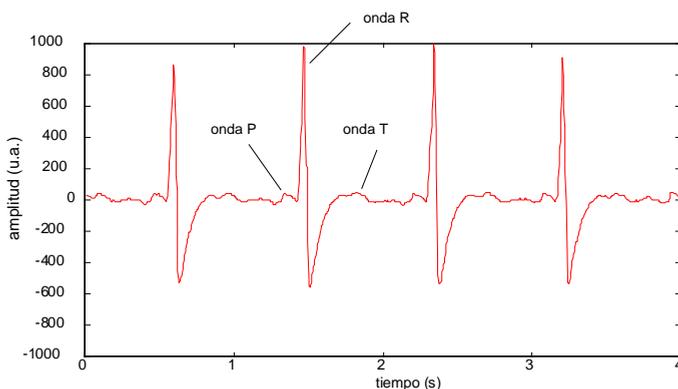


Figura 1.7 Morfología de un EGM unipolar correspondiente a un ritmo sinusal (amplitud en unidades arbitrarias) [obtenido de Millet 1997]

Este tipo de notación deriva de la utilizada en el ECG y no tiene por qué coincidir con la notación empleada por los electrofisiólogos para los electrogramas intracavitarios. La despolarización auricular (onda P) indica el

inicio del ciclo cardíaco. La onda R, resultado de la despolarización de la cámara ventricular, es la parte más importante del electrograma. Su periodicidad (así como su inversa, la frecuencia) se utiliza para determinar la longitud de ciclo y como identificador de posibles arritmias. En base a ello, un ciclo muy lento será clasificado como bradicardia, un ciclo muy rápido será clasificado como taquicardia y un ciclo rápido, desorganizado y caótico será clasificado como fibrilación.

En la presente investigación tienen especial protagonismo determinados parámetros cuya determinación se realiza sobre el electrograma, éstos son:

- en ritmo sinusal, el intervalo QT [Copie et al. 1997, Goldenberg et al. 2006], que en un ciclo del electrograma corresponde al intervalo entre el inicio de la despolarización ventricular (complejo QRS) y el final de la repolarización (onda T),
- en estimulación programada, la aparición de respuestas repetitivas ventriculares –como indicadores de arritmogenicidad–, esto es, despolarizaciones espontáneas no inducidas tras extraestímulos,
- en FV, la velocidad de conducción, a partir de la identificación de los instantes de activación en dos puntos distintos producidos por un mismo frente de onda,
- en FV, los intervalos VV, cuya determinación se ha descrito sucintamente en el apartado anterior, y
- en FV, los patrones de activación, y a partir de los mismos la complejidad de los mapas de activación.

El interés y justificación de todos ellos se detalla en el apartado 1.8, y en el apartado 4.2 se concreta su determinación.

1.1.6 Influencia de la temperatura sobre la función cardíaca

El aumento de la temperatura corporal, como ocurre durante la fiebre, produce un aumento de la frecuencia cardíaca, a veces hasta el doble del valor normal. Análogamente, la disminución de la temperatura produce una reducción en la frecuencia cardíaca que puede llegar a sólo algunos latidos por minuto cuando una persona está cerca de la muerte por hipotermia en el intervalo de temperatura corporal de 16 a 21 °C. Estos efectos se deben probablemente al hecho de que el calor aumenta la permeabilidad de la membrana del músculo cardíaco a los iones cuyas corrientes controlan la frecuencia, acelerando el proceso de autoexcitación.

La fuerza contráctil del corazón habitualmente aumenta de forma transitoria cuando hay un aumento moderado de temperatura, como ocurre durante la realización de ejercicio físico, aunque una elevación prolongada de la temperatura agota los sistemas metabólicos del corazón y finalmente produce debilidad. Por tanto, la función óptima del corazón depende mucho del control adecuado de la temperatura, dicha función de regulación o mantenimiento de la temperatura corporal está incorporada en mecanismos propios del propio cuerpo humano [Guyton and Hall 2007].

1.1.7 Electrofisiología experimental y temperatura

En el ámbito de la electrofisiología cardíaca se han realizado trabajos en los que con diferentes propósitos se introducen modificaciones mediante fármacos [Yashima et al. 1999, Milberg et al. 2005, Hsieh et al. 2009a] o agentes físicos, tales como estiramiento [Chorro et al. 2005, Bode et al. 2006], temperatura [Harada et al. 2008, Hsieh et al. 2009b, Li et al. 2011, Yamazaki et al. 2012]), o estímulos eléctricos, alterando la electrofisiología

de las preparaciones experimentales. El análisis de los efectos de estos cambios sobre los parámetros electrofisiológicos del miocardio y la dinámica del frente de onda, puede proporcionar información valiosa que permita explicar en parte los mecanismos de generación, perpetuación o cese de las arritmias.

Se sabe que las propiedades electrofisiológicas de las células cardíacas se ven influenciadas por la temperatura [Harrison and Bers 1989, Shutt and Howlett 2008]. En consecuencia, el proceso de propagación de la excitación eléctrica en el miocardio puede verse afectado, en condiciones normales o durante las arritmias, por los cambios de temperatura del tejido.

En este trabajo se ha considerado de interés investigar acerca de la influencia de las modificaciones locales de temperatura sobre determinados parámetros electrofisiológicos en distintas condiciones: ritmo sinusal, estimulación programada y en FV, sobre preparaciones experimentales, con el propósito principal de superar algunas de las limitaciones presentes en trabajos anteriores.

1.2 Fibrilación ventricular. Generalidades

El ritmo sinusal normal, entendiéndose por éste aquel que tiene su origen en el automatismo del nódulo SA y se propaga a todo el miocardio a través del sistema de conducción, puede verse afectado por alguna alteración en la frecuencia, el origen o en la transmisión del impulso. En este caso se dice que existe una arritmia. La fibrilación ventricular (FV) es la principal arritmia causante de muerte súbita cardíaca, responsable final del 75 al 85% de estos casos [Bayés et al. 1989]. Así, la incidencia anual en los Estados Unidos oscila entre 180.000 y 450.000 casos que derivan en muerte,

ampliando el estudio a otros países desarrollados, la tasa va de 50 a 100 por cada 100.000 habitantes. Aunque existen pacientes especialmente susceptibles de padecer arritmias ventriculares, éstas también están presentes en población que a priori puede parecer estar exenta de riesgo, como son los casos aparecidos recientemente entre deportistas de élite, que han acaparado la atención de los medios de comunicación, con la consiguiente repercusión en la sociedad [Deo and Albert 2012].

Por estas causas, la FV es clínicamente objeto de estudio desde diferentes perspectivas, especialmente en relación con las estrategias encaminadas a prevenir su aparición y plantear algoritmos seguros para su rápida detección y tratamiento, en el contexto de la desfibrilación automática [Martín-Huerta 1994, Aronow 2010a].

El campo experimental cobra un papel muy importante en el estudio de la electrofisiología del corazón y ayuda a conocer mejor los mecanismos de aparición y perpetuación de estas arritmias, abriendo nuevas vías para mejorar las pruebas diagnósticas, la prevención y el tratamiento de este tipo de situaciones [Jalife 2000, Chorro 2009].

1.2.1 Descripción de la FV

La FV ha sido definida tradicionalmente como una actividad eléctrica cardíaca turbulenta, que implica una gran irregularidad de las ondas eléctricas que producen la excitación ventricular. Durante la FV la activación ventricular es descoordinada, lo que conlleva una tensión sistólica no efectiva. En consecuencia el gasto cardíaco disminuye bruscamente a niveles sumamente bajos, y la muerte habitualmente se produce en unos minutos como consecuencia de la falta de aporte de oxígeno a los órganos vitales,

principalmente el cerebro. En el electrocardiograma la FV se diagnostica por la aparición de una actividad rápida e irregular, con cambios constantes en la morfología de los complejos ventriculares que son completamente aperiódicos e irregulares. A diferencia de lo que ocurre con otras arritmias, el ECG de una FV posee siempre las siguientes características:

- El trazado es rápido y descoordinado
- No puede diferenciarse la onda P
- No se forman complejos QRS
- No existe ninguna actividad ventricular organizada

La *Figura 1.8* muestra un esquema conceptual de la fibrilación ventricular. Los trazados del ECG y del EGM durante la FV se asemejan a una onda sinusoidal distorsionada con frecuencias muy superiores a las de un ritmo sinusal normal, reflejo de múltiples focos de despolarización autosostenidos en el miocardio. La *Figura 1.9* muestra como ejemplo el ECG real de un corazón humano que ha entrado en FV, mientras que en la *Figura 1.10* puede observarse un segmento de dos segundos de FV registrado en la superficie epicárdica de un corazón aislado de conejo —en esta especie la frecuencia es sensiblemente más alta—. Los avances en el conocimiento de los mecanismos básicos que determinan su inicio, su perpetuación o su cese son necesarios para intentar progresar en la prevención de la FV o en la efectividad de los procedimientos aplicados para su interrupción.

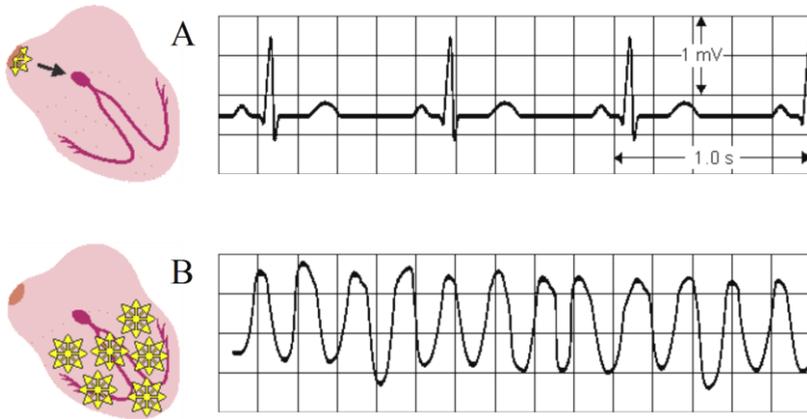


Figura 1.8 A - Ritmo sinusal normal. El impulso se propaga con normalidad desde el nodo SA. B - Fibrilación ventricular. Existen múltiples focos de despolarización en los ventrículos

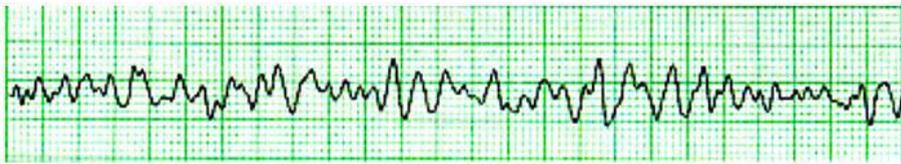


Figura 1.9 Registro del ECG de un corazón humano correspondiente a un episodio de FV, registrado en papel milimetrado a 25 mm/s [obtenido de Stephenson 2004] 250ms



Figura 1.10 Registro del EGM epicárdico correspondiente a un corazón aislado de conejo en FV [Obtenido de Tormos 2005]

1.2.2 Perspectiva histórica de la investigación en FV

Andreas Vessalius en su clásico libro de anatomía titulado *De Humani Corporis Fabrica*, publicado en 1543, ya se refería a los "movimientos

semejantes a gusanos" que ocurrían inmediatamente antes de la muerte en los corazones de animales que él disecaba [Acierno 1994].

La fibrilación ventricular fue descrita probablemente por primera vez por Erichsen en 1842. Este autor la observó tras la ligadura de la arteria coronaria [Erichsen 1842]. Vulpian la etiquetó por primera vez de "movimiento fibrilar" al describirla en 1874, siendo la misma denominación que daba a la fibrilación auricular (FA) [Vulpian 1874]. McWilliam aportó una contribución destacada al describir en 1887, sin la ayuda de la electrocardiografía, muchas de las características de esta arritmia mortal, demostrando cómo la FV en el hombre podía ser revertida mediante la aplicación de choques eléctricos [McWilliam 1887, 1889]. En 1911, Levy y Lewis utilizaron el ECG para demostrar que cuando la FV ocurría durante la anestesia con cloroformo, frecuentemente estaba precedida por la aparición de extrasístoles ventriculares multiformes o por taquicardia ventricular (TV) [Levy and Lewis 1911]. Sin embargo, fue August Hoffman el primero en publicar en 1912 el primer electrocardiograma de fibrilación ventricular en el hombre [Hoffman 1912]. El mismo año, Erlanger observó que corazones grandes de bovino fibrilaban con relativa facilidad y raramente la fibrilación se detenía con KCl, al contrario que ocurría con otros corazones más pequeños [Erlanger 1912].

En 1914, Garrey publicó el primer estudio sistemático de la relación existente entre la FV y el tamaño del corazón, estableciendo que era necesaria una "masa crítica" de tejido, al menos una cuarta parte del músculo ventricular en perros, para sostener la fibrilación [Garrey 1914]. También postuló que la fibrilación era producida por "... series de circuitos anulares de localización cambiante y complejidad múltiple". Garrey observó que

anillos cortados de la base de ventrículos fibrilados de grandes galápagos mantenían el ritmo fibrilatorio. Además, si el anillo se conseguía lo suficientemente delgado, la actividad descoordinada se organizaba en ondas rotatorias alrededor del anillo, de forma similar a lo descrito independientemente por Mines como "movimientos de reentrada circular" [Mines 1913]. Lewis también abogó por el mecanismo de reentrada [Lewis 1915]. Estos estudios sentaron las bases del actual conocimiento de los mecanismos y dinámica de la FV.

De Boer, en 1923, demostró que una sola descarga eléctrica aplicada en la fase final de la sístole en el corazón de la rana desencadenaba la fibrilación de dicha cámara [De Boer 1923]. Louis Katz fue el primero en indicar en 1928 el peligro de las extrasístoles aparecidas en el período de la onda T, y posteriormente Wiggers y Wegria dieron a este intervalo el nombre de período vulnerable [Wiggers and Wegria 1940]. Fue Wiggers el primero en considerar que los frentes de ondas no se desplazaban solamente como circuitos reentrantes bidimensionales, si no en un medio tridimensional [Wiggers 1940].

En la década de los 50 se aceptaba que tanto las taquicardias auriculares como las ventriculares podían producirse por descargas repetitivas de un foco ectópico [Scherf and Schott 1953] o por el desplazamiento de un frente de onda alrededor de un obstáculo [Mines 1914, Weiner and Rosenblueth 1946]. En ambos casos, y bajo ciertas condiciones, se postulaba que el impulso originado en el circuito reentrante o en un foco ectópico podía propagarse tan rápidamente que los tejidos vecinos no eran capaces de responder de un manera regular, dando lugar a la aparición del patrón caótico de la FV en el ECG. Sin embargo, en 1956, Moe propuso que

el mecanismo de la fibrilación era diferente al de la taquicardia, afirmando que durante la fibrilación existía una total desorganización de la actividad. La arritmia fue entonces definida como el resultado de frentes de ondas desplazándose aleatoriamente, cambiando de número y dirección [Moe 1956]. En 1962, Moe postuló la hipótesis de las múltiples ondas de la FA [Moe 1962], y en 1964 Han y Moe establecieron la importancia de la dispersión del período refractario en la inducción de la fibrilación cardíaca [Han and Moe 1964]. En ese mismo año se consolidó la hipótesis de las múltiples ondas mediante el desarrollo del primer modelo computerizado de la fibrilación cardíaca en dos dimensiones [Moe et al. 1964]. El apoyo experimental de esta teoría tuvo que esperar 20 años hasta el desarrollo de la tecnología del “mapeo” de alta resolución con múltiples electrodos. En 1985, Allesie et al., en un modelo canino en el que se inducía FA mediante estimulación programada, confirmaron la teoría de las múltiples ondas descrita inicialmente por Moe [Allesie et al. 1985].

Si bien el modelo por ordenador de Moe pretendía simular la fibrilación auricular, numerosa literatura experimental posterior asume la hipótesis de las múltiples ondas para la FV [Downar et al. 1988, Epstein et al. 1995, Janse et al. 1995, Witkowski et al. 1998]. El consenso tradicional venía siendo que, aunque la activación focal pueda jugar un papel en la iniciación de la arritmia, el mantenimiento de ésta en los ventrículos tridimensionales implica la existencia de múltiples ondas nómadas con trayectorias cambiantes de un ciclo a otro [Moe 1962]. Sin embargo, en los últimos años, el avance en los modelos por ordenador y en la tecnología de “mapeo” cardíaco (sistemas ópticos y de mayor resolución) han reavivado la controversia: ¿es la compleja dinámica de la FV el resultado de la

generación y propagación aleatorias de múltiples ondas independientes [Choi et al. 2001, 2002], o son éstas últimas la consecuencia de la actividad sostenida de algún o algunos focos dominantes que activan los ventrículos a alta frecuencia? [Gray et al. 1995a, Jalife et al. 1998a,b, Samie et al. 2001] Esta cuestión aún es objeto de investigación en electrofisiología cardíaca —ver apartado 1.4.

1.2.3 Aplicaciones clínicas de los estudios sobre la FV

Los avances en el conocimiento de los mecanismos básicos que determinan el inicio de la FV, su perpetuación o su cese, son necesarios para intentar progresar en la prevención de la misma o en la eficacia de los procedimientos utilizados para interrumpirla adecuadamente [Dalzell 1998, Jalife 2000].

El estudio de los mecanismos que regulan la perpetuación de la arritmia ha hecho surgir diversas hipótesis de trabajo que intentan explicar la transición de ritmos regulares hacia ritmos irregulares como la FV. Así, se ha postulado que serían fármacos antifibrilatorios aquellos que potenciaran la estabilidad de la activación reentrante, mientras que favorecerían la transición hacia la fibrilación aquellos que dieran lugar a su desestabilización [Weiss et al. 1999, Riccio et al. 1999, Cao et al. 1999, Hao et al. 2004], hecho que se ha relacionado con las características de las curvas de restitución de las propiedades eléctricas del miocardio ventricular [Riccio et al. 1999, Qu et al. 1999, Weiss et al. 2002].

Asimismo, los algoritmos de identificación de la FV en sus distintas manifestaciones son necesarios para conseguir el tratamiento eficaz de la arritmia mediante desfibriladores, tanto implantables como externos, estos

últimos en el contexto de la desfibrilación con sistemas automatizados [Kern 1998]. Tanto la caracterización de la arritmia a partir del ECG de superficie o de los registros endocavitarios, como la predicción de los cambios en el patrón fibrilatorio inducidos por fármacos u otros procedimientos, son útiles para perfeccionar los algoritmos de identificación de la arritmia en diversas situaciones y contextos [Waldo 1998, Jetova and Mitev 2002, Kaup et al. 2004].

Por otra parte, el análisis de los mecanismos implicados en la desfibrilación eléctrica hace posible optar por equipos cada vez más eficaces, tanto por sus modos de estimulación como por sus planteamientos. La investigación encaminada a conseguir otros procedimientos de desfibrilación además de los basados en los choques de corriente continua, bien sea utilizando otros modos de estimulación, o bien se trate de procedimientos basados o combinados con la administración de fármacos, es una de las tareas que pueden aportar resultados prometedores en el ámbito de los estudios sobre la FV [Larsen et al. 2002].

1.3 Mecanismos de las arritmias. La reentrada

En condiciones normales, un único impulso generado en el nodo sinusal activa las aurículas y los ventrículos. El impulso se propaga dando lugar a una onda de activación que despolariza los tejidos adyacentes excitables y va dejando atrás tejido inexcitable. Cuando esta onda de activación alcanza el final del músculo y queda rodeada de tejido inexcitable, se extingue. Hasta que no se genere un nuevo impulso sinusal, no se volverá a activar el corazón. Sin embargo, en ciertas circunstancias, la activación puede persistir sin extinguirse en una zona del corazón, durante el tiempo suficiente para

que el tejido vecino recupere su excitabilidad —superando por tanto su período refractario—, con lo que el mismo impulso vuelve a reexcitar parcial o totalmente el corazón.

Este estímulo se llama estímulo reentrante, y el mecanismo por el que se produce, reentrada. El papel de la reentrada fue demostrado separadamente por Mines y Garrey [Mines 1913, Garrey 1914]. En las experiencias que desarrollaron estos autores observaron que un anillo de tejido excitable estimulado en un solo punto propaga dos frentes de activación en direcciones opuestas que acaban cancelándose mutuamente al producirse su encuentro tras rodear el anillo.

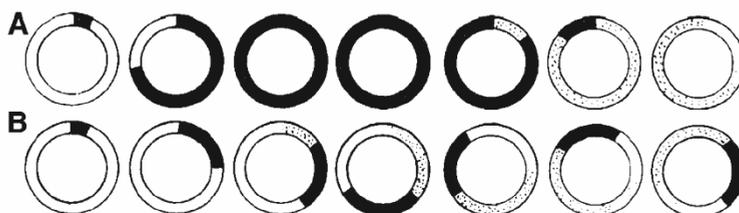


Figura 1.11 Modelo de reentrada anatómica. Tejido excitado, refractario, marcado en negro; excitable en blanco; refractario relativo a puntos. A: longitud de onda de la excitación mayor que la longitud del anillo. B: longitud de onda menor. Tras el giro, el frente de onda encuentra siempre tejido excitable; se genera la reentrada [obtenido de Mines 1913]

Pero si se genera un área de bloqueo transitorio que interrumpe prematuramente uno de los frentes —y que permite que el otro circule retrógradamente por el camino del anterior—, entonces se establece un fenómeno de movimiento circular autosostenido (*Figura 1.11*). Sin embargo, para que esto ocurra en el miocardio, debería existir algún tipo de

heterogeneidad. En la práctica, una zona isquémica o infartada podría constituir el obstáculo central que posibilitara la existencia del fenómeno.

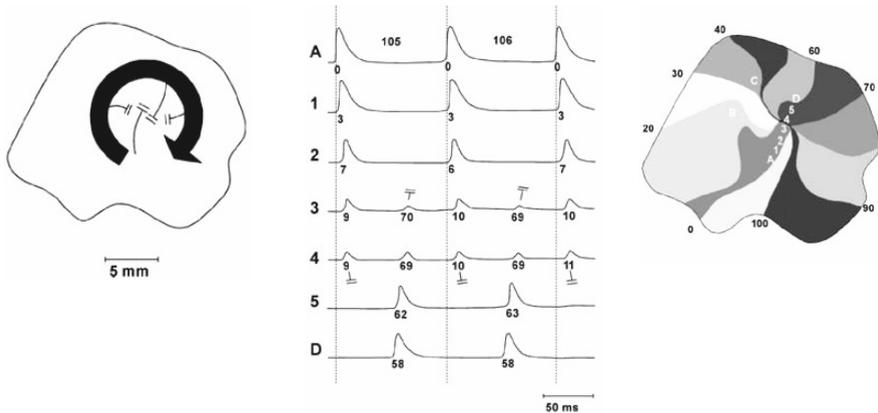


Figura 1.12 Reentrada funcional durante una taquicardia ventricular. Representación esquemática del movimiento reentrante con los bloqueos funcionales del núcleo (izq.), mapa de activación con isócronas a intervalos de 10 ms (dcha.) y electrogramas registrados en los puntos indicados (centro) [modificado de Allesie et al. 1977]

La ruta que conduce el impulso de nuevo al punto de partida, puede ser un circuito alrededor de un obstáculo anatómico central (reentrada anatómica), pero también alrededor de una región de tejido inexcitable debido a la refractariedad prolongada de sus células (reentrada funcional). Allesie et al. caracterizaron diferentes tipos de excitación circular en aurículas de conejo, distinguiendo entre estos dos tipos de reentrada [Allesie et al. 1973, 1976, 1977] (*Figura 1.12*). Los circuitos de localización y tamaño estables dan lugar a reentradas ordenadas; los inestables generan reentradas desordenadas que pueden desembocar en FV.

Entre los factores electrofisiológicos que favorecen la reentrada se encuentran la disminución de la velocidad de conducción y el acortamiento

del período refractario, así como la dispersión de la duración del potencial de acción (APD) y la refractariedad. Estas circunstancias, unidas a la aparición de un estímulo prematuro, pueden crear un bloqueo unidireccional en el tejido y por tanto una reentrada. La aparición de este estímulo puede ser debida a la automaticidad anormal de algún grupo de células. En la práctica clínica, el aumento del tamaño del corazón, las drogas que alteran la refractariedad y el APD, y la existencia de zonas de tejido isquémico, necrosado o fibrótico pueden facilitar el fenómeno de reentrada.

La actividad reentrante en el tejido miocárdico ha sido objeto de estudio de numerosos trabajos experimentales y simulaciones por ordenador, donde se ha analizado el papel de la reentrada en la generación y sustentación de arritmias, en concreto la fibrilación ventricular —ver apartados 1.5 y 1.4.

1.4 Teorías sobre la FV

Se sabe que la fibrilación ventricular es el resultado de una propagación turbulenta de la onda eléctrica de excitación cardíaca. Sin embargo, y a pesar de los numerosos avances al respecto, los mecanismos exactos de su inicio y mantenimiento permanecen todavía por descifrar. La aplicación de herramientas metodológicas cada vez más potentes, ha permitido que durante los últimos veinte años, nuevos trabajos experimentales y simulaciones por ordenador hayan aportado luz sobre estos mecanismos. Estas investigaciones también han revelado diferentes manifestaciones de la arritmia, y han dado lugar a diversas hipótesis sobre su generación y perpetuación. Si bien ya han sido citadas en la clasificación metodológica

del apartado anterior, ahora en éste se pretende clarificar las principales teorías que actualmente son objeto de controversia e investigación.

1.4.1 Teoría de las ondas múltiples de Moe

Durante las últimas décadas, la hipótesis dominante sobre el mecanismo de la FV ha sido la de las ondas múltiples de Moe [Moe et al. 1964], quien formuló esta teoría sobre la base de simulaciones por ordenador de una matriz bidimensional de elementos excitables acoplados (autómata celular) con períodos refractarios aleatoriamente distribuidos. Según Moe, la fibrilación sobreviene como el resultado de la heterogeneidad en la refractariedad del tejido cardiaco. Una estimulación rápida, con intervalos de acoplamiento extremadamente cortos, provoca que sólo las células con mayor período refractario fallen en la respuesta. Como resultado se produce una fragmentación de las ondas de excitación y la formación de múltiples ondas más pequeñas que forman lazos de reentrada inestables y ambulantes.

Ocasionalmente, éstas desaparecen al chocar con otras ondas o con límites anatómicos. También pueden disgregarse y generar ondas hijas antes de encontrar zonas refractarias. Si el tamaño del tejido y el número de ondas son suficientemente grandes, el mantenimiento de la arritmia está asegurado. Esta hipótesis (*multiple-wavelets*) logra explicar el fenómeno experimental de la persistencia de la FV tras el cese de la estimulación y la existencia de una determinada masa crítica. En relación con ella, ha habido numerosos intentos de caracterizar la distribución espacial de los períodos refractarios en el miocardio normal e isquémico, así como determinar la relación entre esta distribución y la incidencia de la arritmia [revisiones en Janse 1998 y Antzelevitch et al. 1999]. Estos estudios han evidenciado una correlación

positiva entre heterogeneidad refractaria y fibrilación, pero no han podido probar fehacientemente que la primera sea una condición indispensable para el inicio y mantenimiento de la segunda.

1.4.2 Teoría del rotor madre

El desarrollo de métodos avanzados de visualización del proceso eléctrico en el corazón —electrodos múltiples y más recientemente el “mapeo” óptico— así como la capacidad de nuevos métodos numéricos para el análisis de datos, han dado lugar a numerosos estudios que han cuantificado los patrones de excitación en la superficie del corazón durante la FV. De estos estudios se deriva que los patrones de activación pueden diferir significativamente de lo que predice la hipótesis de múltiples ondas de Moe. La diferencia principal es el pequeño número de estas ondas y su corta vida media. Como demostraron Gray et al. (1995b), en casos extremos la FV estaría producida por una única onda espiral nómada. Estos autores estimaron que, en promedio, el número de ondas espirales coexistentes simultáneamente durante la FV sería 1-2 en conejos, 5 en ovejas y 15 en humanos, muchas de ellas sin llegar a completar un ciclo completo de reentrada [Gray et al. 1998].

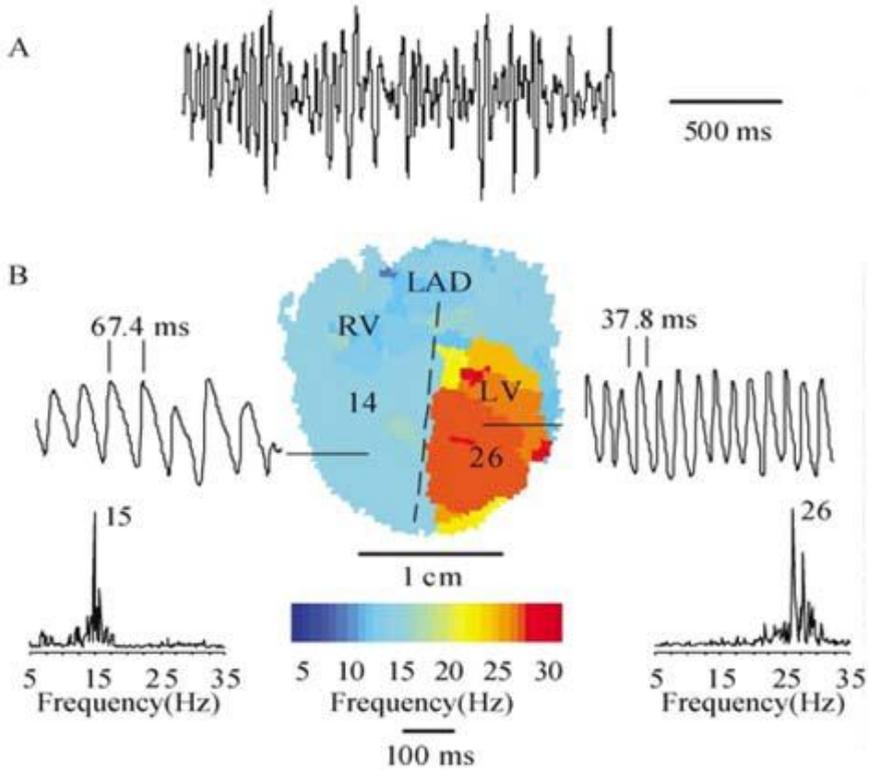


Figura 1.13 Análisis frecuencial de la FV mediante mapping óptico. A: ECG fibrilatorio. B: Mapa de frecuencias dominantes, registros y espectros correspondientes a un píxel de cada ventrículo. Datos procedentes de un corazón aislado de cobaya [obtenido de Samie et al. 2001]

El reducido número de ondas superficiales y la corta vida media de éstas podrían indicar que la FV es mantenida no por múltiples ondas ambulantes sino por unos pocos focos estables de activación rápida intramurales. Debido a su alta frecuencia las ondas generadas se fragmentarían, dando así lugar al complejo patrón que caracteriza a la FV. La posibilidad de este fenómeno de fibrilación inducida o "conducción fibrilatoria" ya fue considerado en relación con la fibrilación auricular [Moe

and Abildskov 1959, Jalife et al. 1998a,b] y ha sido demostrado en humanos. Concretamente se ha constatado que un foco de FA puede ser identificado y eliminado por ablación, con el consecuente cese de la fibrilación [Jais et al. 1997, Haissaguerre et al. 2002]. Las evidencias experimentales de la propagación fibrilatoria se han puesto más recientemente de manifiesto al estudiarse la distribución de frecuencias de excitación (*Figura 1.13*) en las superficies endocárdicas y epicárdicas [Samie et al. 2001, Zaitsev et al. 2003, Wu et al. 2004]. Los mapas típicos de frecuencias dominantes (*Figura 1.14*) resultaron ser más simples y organizados de lo esperado, con unos pocos dominios o regiones de frecuencia uniforme con cierta estabilidad. Estos datos sugieren que los focos de alta frecuencia son los que propagan la fibrilación, y que los patrones complejos de la FV se deben a procesos secundarios de interacción con las heterogeneidades del medio, anatómicas y funcionales, de las ondas generadas por estos focos. Los autores postulan que estos focos son como vórtices, a modo de torbellinos o espirales tridimensionales ocultas entre las paredes ventriculares. La mayoría de estudios experimentales están realizados sobre modelos de corazón de pequeños mamíferos, pero la existencia de rotores de cierta estabilidad también ha sido constatada por Rogers et al. (1999, 2003) en corazones de cerdo de gran tamaño, aunque sin encontrar evidencias de que éstos fueran responsables de la FV.

Aunque los resultados de estos trabajos apoyan la teoría de que existe un foco principal responsable de la fibrilación (“*mother rotor hypothesis*” o “*focal source hypothesis*”), otros investigadores han encontrado nuevos indicios de lo contrario. Los trabajos de Choi et al. (2001, 2002) y Valderrabano et al. (2002) —con corazones aislados de cobaya los

primeros y de cerdo el segundo— no encuentran evidencias de conducción fibrilaria, sino de dominios de frecuencia cambiantes de corta vida media, sugiriendo que la FV es mantenida por múltiples ondas inestables.

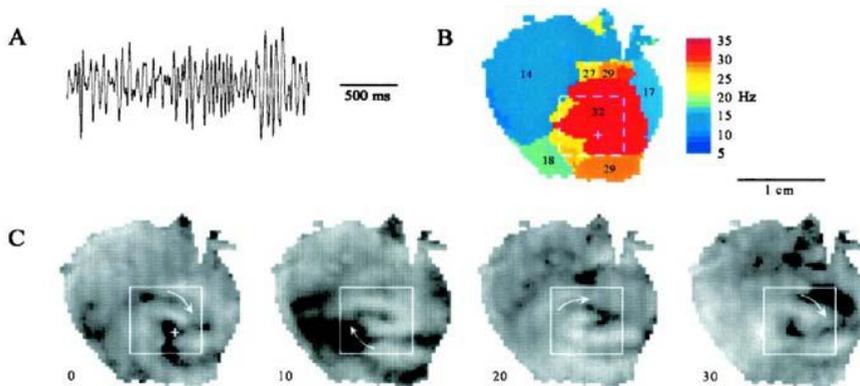


Figura 1.14 Dominios de frecuencias durante la FV y rotor madre. A: ECG fibrilatorio. B: mapa de frecuencias dominantes. C: Fotogramas tomados en 4 instantes (valores en ms) de una rotación completa de un rotor estable de alta frecuencia localizado en la pared anterior del VI [obtenido de Samie et al. 2001]

1.4.3 Hipótesis de la rotura de rotores y la restitución

El crecimiento exponencial de la capacidad computacional ha potenciado las posibilidades de los modelos por ordenador para la propagación de la excitación cardíaca. Los estudios con modelos de autómatas celulares se han visto sustituidos por estudios con modelos que describen con mayor exactitud las interacciones entre células adyacentes y corrientes transmembrana [Luo and Rudy 1994, Panfilov 1999b, Tusscher et al. 2004, Livshitz et al. 2005], permitiendo la simulación de reentradas funcionales (también referidas como rotores de reentrada o espirales de reentrada) en grandes áreas bidimensionales [Winfree 1989, Panfilov and Holden 1990].

La onda espiral inicial acaba fragmentándose en ondas más pequeñas que giran sobre sí mismas creando otras espirales y en ocasiones fragmentándose a su vez para acabar complicando el patrón fibrilatorio. Este patrón es similar al descrito por Moe pero con una importante diferencia: ocurre en tejido cardíaco homogéneo. Este fenómeno se conoce como "rotura de rotores" (*spiral wave breakup*) y constituye la base para una alternativa a la teoría de las ondas múltiples de Moe. Panfilov y Hogeweg (1995, 1996), demostraron que la naturaleza tridimensional del tejido excitable facilita la rotura de la espiral. En un modelo anatómico del corazón basado en medidas experimentales exhaustivas de la estructura cardíaca [Hunter et al. 1997] comprobaron que el tamaño del corazón debía ser mayor que la longitud de onda de la espiral para que ésta se fragmentara dando así lugar a la FV [Panfilov 1999a,b].

Aunque el mecanismo exacto de la rotura de la espiral aún no se conoce, hay muchas evidencias de que está relacionado con una inestabilidad consistente en la "alternancia" del APD. El fenómeno se conoce desde principios del siglo XX [Mines 1913] pero ha sido en la última década, mediante modelos matemáticos computacionales, cuando se ha estudiado intensivamente en relación con la estabilidad de la reentrada [Courtemanche et al. 1996]. La alternancia del APD ocurre cuando la pendiente de la curva de restitución del APD (electrical restitution curve) es mayor que la unidad [Nolasco and Dahlen 1968, Guevara et al. 1984, Courtemanche et al. 1996]. Esta curva relaciona el APD con el intervalo diastólico o tiempo transcurrido desde el final del potencial de acción (PA) precedente hasta el inicio del actual. Cuando las oscilaciones del APD son suficientemente grandes, se produce la ruptura de la espiral (*Figura 1.15*) [Qu et al. 1999, Weiss et al.

1999]. Koller et al. (1998) demostraron en modelos experimentales la existencia de curvas de restitución con pendientes máximas mayores que la unidad. Esta teoría —teoría de la restitución— ha sido apoyada por estudios en relación con la acción protectora de la FV que poseen algunos fármacos capaces de reducir la pendiente de la curva de restitución [Riccio et al. 1999, Garfinkel et al. 2000], previniendo la FV o incluso convirtiéndola en algunos casos en TV [Weiss et al. 1999]. Estudios experimentales recientes ponen de manifiesto que, además de la pendiente de esta curva, juegan un importante papel las dispersiones espaciales de la restitución del APD y la velocidad de conducción [Banville and Gray 2002].

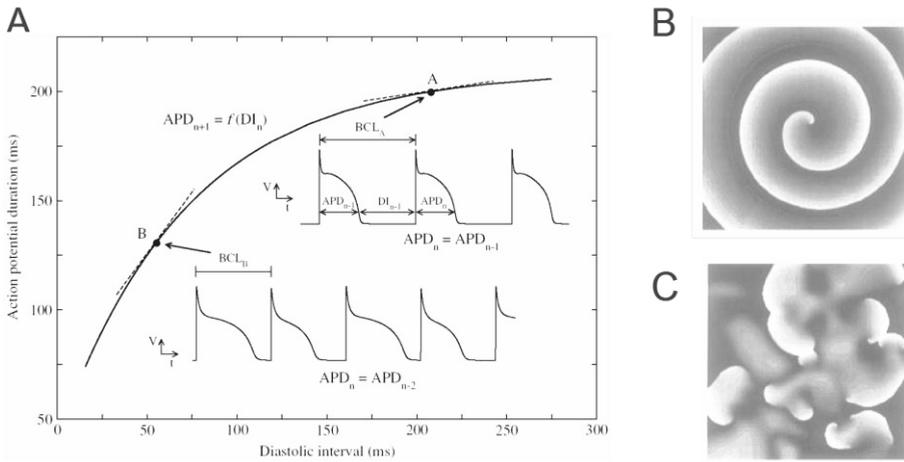


Figura 1.15 Rotura de rotores y restitución. A: Curva típica de restitución del APD. La duración del PA depende del intervalo diastólico precedente. Según la hipótesis de la restitución, si la longitud del ciclo de activación (BCL) corresponde a una zona con pendiente mayor que la unidad (punto B) resulta una secuencia largo-corto-largo de potenciales de acción, fenómeno conocido como alternancia del APD. B: Simulación de una espiral estable. C: Simulación de la desestabilización y fragmentación de la espiral, asociados a la alternancia del APD [obtenido de Weiss et al. 1999]

1.4.4 Estado Actual

Aunque las tres hipótesis anteriores son las más extendidas, no constituyen el conjunto de mecanismos que se han propuesto para la FV. Otros mecanismos alternativos para la rotura de rotores, los cuales no requieren una curva de restitución abrupta, han sido descubiertos en simulaciones tridimensionales por ordenador [Chudin et al. 1999; Fenton et al. 2002]. Por ejemplo, la rotura de la espiral podría deberse a la anisotropía tridimensional del miocardio, debida a la rotación intramural de sus fibras. Se produciría un enrollamiento e inestabilidad del centro de organización del torbellino (filamento) que acabaría multiplicándose y fragmentándose al chocar con los límites del corazón. Choi et al. (2003), en trabajos con modelos de corazón aislado, encuentran nuevas evidencias de la influencia de la anisotropía de las fibras en la dinámica de la FV. ¿Cuál de los mecanismos propuestos hasta ahora es relevante? La formulación de esta pregunta parece asumir que la fibrilación es un solo fenómeno y que por tanto debería tener una única explicación. Sin embargo, cuanto más se sabe sobre ella más claro parece que éste podría no ser el caso.

La FV podría no sólo tener varias manifestaciones y grados de complejidad, sino también varios mecanismos [Panfilov and Pertsov 2001, Wu et al. 2002, Chen et al. 2003].

No obstante, y simplificando al máximo la polémica, podría decirse que los investigadores al respecto se dividen actualmente en dos escuelas de pensamiento distintas. La primera considera la FV como un problema de inestabilidad y transitoriedad de rotores efímeros, los cuales se fragmentan en múltiples y pequeñas ondas espirales que se propagan aleatoriamente y dan finalmente lugar al carácter turbulento de esta arritmia. La rotura de

ondas sería por tanto el verdadero mecanismo de la FV, con la reciente apreciación de que, además del mecanismo tradicional de las heterogeneidades anatómicas o electrofisiológicas, la fragmentación es facilitada por las inestabilidades de la dinámica de la restitución. La segunda considera, en contraste con los mecanismos de ruptura, que, con las condiciones adecuadas, un único o pocos rotores de alta frecuencia con un carácter marcadamente estacionario serían los auténticos responsables de la FV. La rotura de ondas en la fibrilación sería un proceso pasivo debido al bloqueo de la conducción fibrilatoria de los impulsos emanados del foco principal, que se fragmentarían de una manera más organizada que aleatoria al interaccionar con heterogeneidades fijas del tejido, lo que acabaría generando el complejo patrón fibrilatorio.

1.5 Aproximaciones metodológicas al estudio de la electrofisiología cardíaca

1.5.1 Estudios basados en trabajos experimentales

Los trabajos experimentales encaminados al estudio de la FV persiguen objetivos muy diversos que abarcan desde el análisis del papel de la isquemia y la necrosis miocárdica [Wit and Janse 1992], hasta las técnicas y procedimientos para conseguir una desfibrilación efectiva [Curtis 1994].

Se han utilizado preparaciones experimentales in situ [Zipes et al. 1975, Aupetit et al. 1993, Chorro et al. 1996, Dorian y Newman 1997, Kwan et al. 1998], modelos de corazón aislado [Curtis 1998, Witkowski et al. 1998, Chorro et al. 1998, Wolk et al. 1999], láminas de tejido miocárdico o preparaciones con cultivos celulares de miocitos [Tovar and Jones 1997].

Los estudios planteados han sido numerosos, tales como el análisis de los mecanismos de inicio y cese [Cha et al. 1994], la interferencia de los procesos fibrilatorios mediante técnicas de sobreestimulación, la demostración de ventanas excitables (“*gaps*”) durante la arritmia [Kirchhof et al. 1993, Kenknight et al. 1995, Chorro et al. 1998], el papel de la masa miocárdica en la perpetuación del proceso fibrilatorio [Garrey 1914, Zipes et al. 1975, Kim et al. 1997, Chorro et al. 2007], los efectos desfibrilatorios o protectores de los fármacos [Wiener y Rosenblueth 1946, Zhou et al. 1992, Dorian y Newman 1993, Wolk et al. 1999] o la eficacia de las técnicas desfibrilatorias [Zhou et al. 1993, Chen et al. 1998, Dillon y Kwaku 1998, Dalzell 1998], entre otros.

En dichos estudios experimentales se precisa registrar la actividad eléctrica del corazón durante la activación miocárdica. De los electrogramas obtenidos se pueden determinar variables íntimamente relacionadas con las propiedades electrofisiológicas como la refractariedad, la conducción o el automatismo.

En función de las técnicas de registro y análisis utilizadas, los trabajos experimentales sobre la FV pueden basarse en el análisis de las características del ECG de superficie, de las señales obtenidas con electrodos extracelulares o intracelulares, o con técnicas basadas en procedimientos ópticos. Las técnicas cartográficas requieren el registro de la actividad en múltiples puntos simultáneamente.

Para esta investigación se ha encontrado oportuno realizar el estudio de parámetros electrofisiológicos obtenidos a partir de registros extracelulares.

1.5.2 Preparaciones de origen animal. Legislación

En el campo de la electrofisiología cardíaca son ampliamente utilizadas las preparaciones experimentales de origen animal. Entre las especies más empleadas se encuentran: oveja, cerdo, conejo, cobaya y ratón (para revisión ver Chorro et al. 2009). La extrapolación de los resultados de dichos trabajos al ser humano debe efectuarse teniendo en cuenta las diferencias interespecies [Janse et al 1998, Romero et al 2010].

En relación con los aspectos legales a considerar, en estos trabajos es de aplicación lo establecido en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 21 de octubre de 2005), y 86/609/EEC, Artículo 5, Apéndice II.

El grupo de investigación en el que se ha realizado el trabajo cuenta con amplia experiencia en la experimentación con conejos. Los recursos materiales (laboratorio, instrumentación) con los que se cuenta están adaptados a dicha especie. Adicionalmente, frente a otras especies más pequeñas como roedores, el conejo presenta una mejor adecuación para realizar estudios de FV, pues permite un mantenimiento de la misma más eficaz.

Por las razones expuestas, para realizar la presente investigación se ha encontrado conveniente emplear modelos animales obtenidos a partir de conejos de la raza New Zealand siguiendo lo establecido en el Real Decreto citado anteriormente.

1.5.3 Experimentación con corazón aislado y perfundido

La investigación con corazón aislado y perfundido se remonta a la segunda mitad del siglo diecinueve². Pocos procedimientos metodológicos se han mantenido hasta la actualidad con tan pocos cambios, contribuyendo durante todo ese tiempo al conocimiento fundamental de la función cardiaca, el flujo coronario y el metabolismo cardíaco [Riascos et al. 2004].

En 1895, Oscar Langendorff fue el primero en conseguir un corazón aislado de mamífero con plena actividad contráctil. A partir de este primer experimento, el método Langendorff [Langendorff 1895, 1903] ha constituido un pilar en la investigación farmacológica y fisiológica del corazón, participando en los mayores avances en el campo de la cardiología. Actualmente sigue siendo una herramienta utilizada por multitud de grupos de investigación, muchos de ellos de primer nivel mundial, que han realizado numerosas e importantes contribuciones al conocimiento en arritmias cardíacas [Gray et al. 1998, Meyer et al. 2004, Chorro et al. 2009, Bradley et al. 2011].

El objetivo básico del método Langendorff es proveer al corazón aislado del oxígeno, electrolitos y metabolitos necesarios por medio de una simple cánula insertada en la aorta ascendente. El líquido nutricio, calentado previamente a la temperatura basal de 37°C, es impulsado a través de la aorta en el sentido contrario al de la circulación sanguínea. Esta perfusión retrógrada de la aorta cierra las válvulas aórticas y fuerza la circulación del fluido por las arterias coronarias durante el período diastólico, como ocurre en el ciclo cardíaco normal. El líquido continúa entonces a través del sistema

² Perspectiva histórica completa en "The isolated perfused heart and its pioneers" [Zimmer 1998]

coronario y eventualmente sale por el seno coronario en la aurícula derecha, pasa al ventrículo derecho y se expulsa por la arteria pulmonar.

El flujo coronario necesario depende del tamaño del corazón, en el caso de de conejo adulto se sitúa en torno a 30 ml por minuto y la presión del líquido se mantiene alrededor de 60 mmHg. Con esta técnica, las cámaras izquierdas del corazón permanecen esencialmente sin líquido, y los ventrículos se contraen contra la presión atmosférica de su interior.

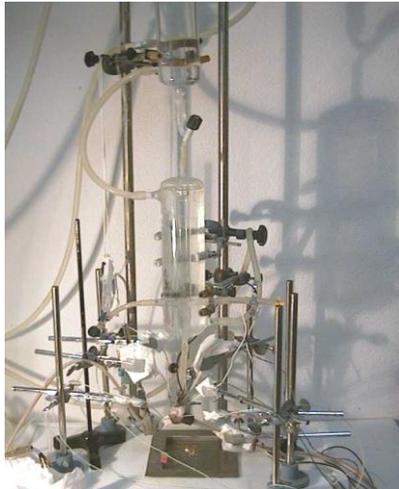


Figura 1.16 Sistema de perfusión Langendorff

El sistema está formado por diversos tubos y cámaras de vidrio, por los que circula el líquido de perfusión antes de llegar a la cánula de inyección (*Figura 1.16*). Este líquido es impulsado desde un depósito exterior —en dicho depósito se realiza la oxigenación— hasta la parte más elevada por medio de una bomba peristáltica, habiendo pasado previamente por un filtro y un depósito de calentamiento. La presión de perfusión es

controlada manual o automáticamente con ayuda de un manómetro integrado en el sistema.

Tras su conexión al sistema, el corazón se muestra en un primer momento inanimado —así lo ha estado desde el instante de su extracción manteniéndolo en Tyrode frío—, pero pasados unos segundos recupera la automaticidad, propiedad intrínseca de este órgano. Gracias a la perfusión constante de las arterias coronarias con el líquido nutritivo, el corazón, aislado del resto del cuerpo, seguirá contrayéndose y relajándose al ritmo cardíaco normal (ritmo sinusal) durante horas.

De esta forma, un sistema de soporte metabólico tipo Langendorff como el descrito es adecuado para realizar el trabajo experimental sobre el que sustentar la presente investigación.

1.5.4 Análisis de las características del ECG

Wiggers et al., en 1930, describieron las características del proceso fibrilatorio y sus fases evolutivas combinando el análisis de las señales electrocardiográficas y el del movimiento de las paredes ventriculares obtenido mediante técnicas cinematográficas que permitían describir la progresión de las ondas de contracción durante la FV. La variación en la amplitud de las ondas del ECG ha sido uno de los parámetros utilizados para caracterizar la evolución del patrón fibrilatorio desde su inicio [Moe et al. 1941], y se ha discutido la utilidad de distinguir entre FV gruesa (mayor amplitud) y fina (menor amplitud) para establecer momentos diferenciados en la evolución de la misma. Así, Jones y Klein (1984) observaron que durante la FV de reciente inicio coexisten simultáneamente episodios de "fibrilación gruesa" y "fibrilación fina", siendo sólo la fina la que persistiría

tras 15 minutos. En estos estadios más tardíos de la arritmia, la FV fina probablemente refleja degeneración de la excitabilidad celular inducida metabólicamente. Weaver et al. (1985) concluyen que la aparición de la FV fina está relacionada en parte con la demora en el inicio del tratamiento de la arritmia, y que la amplitud de la fibrilación es un poderoso indicador del éxito tras la parada cardíaca. El análisis del trazado del ECG para la detección e identificación de la FV representa también un campo ampliamente explorado. Así, Nygards y Hulting (1977) propusieron un análisis frecuencial de la señal de ECG para la identificación de la FV durante la monitorización de pacientes en unidad de vigilancia intensiva. Diversos estudios posteriores han propuesto distintos algoritmos, basados tanto en el dominio frecuencial como en otros (*wavelet*, tiempo-frecuencia) para la detección de la FV o la discriminación entre FV y otras arritmias —como la TV o la taquicardia supraventricular— de cara a su aplicación en la desfibrilación automática [Thakor et al. 1990, Aubert 1994, Millet 1997, Jetova and Mitev 2002, Jetova and Krasteva 2004].

1.5.5 Registros intracelulares

Los estudios clásicos de Sano et al. (1958) y de Akiyama (1981), en los que se utilizaron microelectrodos para obtener los registros intracelulares o potenciales de acción (PA) de las fibras miocárdicas durante la FV, revelaron que el potencial de reposo, el PA y la pendiente de ascenso del mismo disminuían durante la activación rápida e irregular característica de la FV [Hogancamp et al. 1959]. Las observaciones efectuadas utilizando registros de los PA monofásicos han aportado información sobre los procesos fibrilatorios en el corazón humano [Swartz et al. 1993]. Durante la

FV los ciclos definidos por los potenciales consecutivos eran más cortos que durante otras arritmias como las TV polimorfas. Asimismo, prácticamente no se registraron períodos diastólicos, es decir, no se alcanzaba la repolarización completa y había cierto grado de fraccionamiento de las señales registradas.

Girouard y Rosenbaum (1996), mediante técnicas ópticas y registros simultáneos de PA con microelectrodos, constataron que, con la técnica de “mapeo” óptico empleando tintes voltaje-dependientes, es posible obtener representaciones muy aproximadas de los potenciales de acción, con gran resolución y flexibilidad espacial, algo imposible con las técnicas convencionales.

1.5.6 Técnicas electro-cartográficas (“mapping”)

Los procedimientos electro-cartográficos permiten obtener información espacial y temporal sobre la activación miocárdica de una determinada zona durante las arritmias, con la que estudiar su dinámica. Con dicha información se puede realizar el trazado de líneas isócronas que definen los frentes de activación en la zona abarcada por el electrodo (mapas de activación). También pueden ser de interés, los mapas de isopotenciales que muestran las zonas con idéntica amplitud de los voltajes en un momento determinado y sus variaciones temporales, o los mapas de isofrecuencias que permiten visualizar la existencia de distintos focos de activación rápida o de dominios caracterizados por una frecuencia local predominante.

Los trabajos experimentales sobre estudios de la dinámica del frente de onda que se publican actualmente encuentran soporte en dos metodologías. La más reciente es la basada en el sistema óptico que emplea

sustancias colorantes cuya fluorescencia depende del voltaje, mientras que la clásica o convencional se basa en dispositivos electrodo multipolares³ en contacto con el tejido miocárdico. En este último caso, dependiendo de la zona en contacto los registros pueden ser epicárdicos, endocárdicos y/o intramiocárdicos.

Aunque la cartografía óptica pudiera parecer a priori metodológicamente superior dada la gran resolución obtenida, no está exenta de limitaciones. Se trataría de la presencia de artefactos y ruido relacionados con el movimiento de la preparación, la potencial toxicidad de los colorantes, o alteraciones en la contractilidad por el uso de desacoplantes mecano-eléctricos [Efimov 2004]. En ese sentido, la metodología tradicional de dispositivos electrodos multipolares sigue totalmente vigente, estando exenta de las anteriores limitaciones.

Durante los últimos 30 años, los dispositivos de registro multipolares de 16, 24 y 48 canales, han dado paso a sistemas de hasta 512 canales, basados en ordenador y con múltiples capacidades de “mapeo”⁴. Estos sistemas, mediante el registro simultáneo de los electrogramas unipolares o bipolares, han permitido el estudio de la FV cada vez con mayor resolución espacial y temporal, p.e. trabajos con 27 electrodos [Ideker et al. 1981], 192 electrodos [Dillon et al. 1988], 256 electrodos [Brugada et al. 1990] o 512 electrodos [Rogers et al. 1999].

³ Se trata de un dispositivo que resulta de agrupar un conjunto de electrodos individuales, generalmente unipolares, denominados canales que están regularmente distribuidos conformando una matriz en la superficie de contacto epicárdica, cada canal constituye un punto de registro o exploración.

⁴ Perspectiva histórica completa en "Evolution of Mapping and Anatomic Imaging of Cardiac Arrhythmias" [Packer 2004]

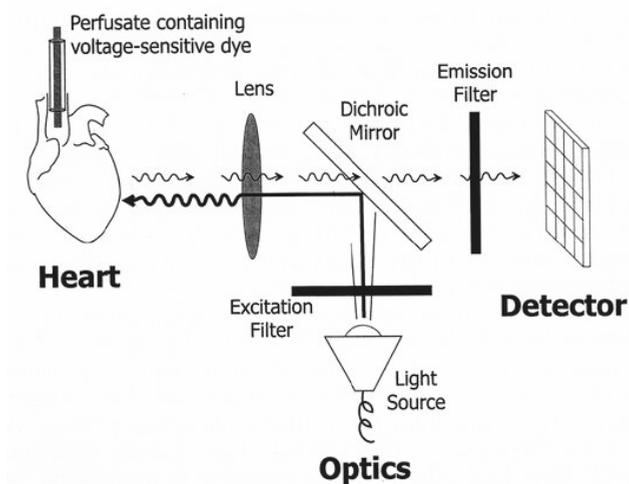


Figura 1.17 Representación funcional de un sistema de “mapeo” óptico típico. La fuente de luz estimula la fluorescencia voltaje-dependiente de las moléculas del tinte, que ejercen de microsensors del potencial de membrana de las células cardíacas adyacentes, creando así una especie de potencial de acción óptico [obtenido de Rosenbaum and Jalife 2001]

El conocimiento de las arritmias ventriculares progresaría de nuevo con la aparición y desarrollo en paralelo, en la última década del pasado siglo, del “mapeo” óptico basado en fotodiodos o dispositivos CCD⁵ utilizados conjuntamente con tintes sensibles al voltaje y desacoplantes mecano-eléctricos, todo ello aplicado al estudio de las arritmias en preparaciones in vitro [Davidenko et al. 1992, Efimov et al. 1994, Girouard et al. 1996, Choi et al. 2001]. En el sistema óptico, la fluorescencia que provocan los cambios del potencial transmembrana de las células cardíacas en marcadores sensibles a los cambios de voltaje, es registrada por

⁵ Descripción de la técnica y revisión completa en "Optical mapping of cardiac excitation and arrhythmias" [Rosenbaum and Jalife 2001] y "Optical Mapping Of Cardiac Arrhythmias" [Arora et al. 2003]

videocámaras digitales de alta resolución espacial y temporal (*Figura 1.17*) [Gray et al. 1998, Lou et al. 2011]. Las imágenes obtenidas de la activación epicárdica son procesadas y analizadas “píxel” a “píxel” mediante técnicas de tratamiento de imagen.

Ideker et al. (1981), empleando 27 electrodos epicárdicos en las paredes de ambos ventrículos, cartografiaron los tres primeros segundos de la transición de la TV a la FV. En modelos de reperfusión isquémica, estos investigadores hallaron que la activación en el inicio de la FV se generaba en las fronteras de la zona isquémica y se propagaba en aparente organización hacia el resto de los ventrículos. Debido al limitado número de electrodos, no pudieron establecer la localización específica o la naturaleza de la arritmia.

Bayly et al. (1993), investigaron cuál debería de ser la distancia interelectrodo adecuada para mapear la FV sin pérdida de información significativa acerca de la secuencia de activación. Según el criterio de Nyquist, se requiere un espacio interelectrodo más pequeño que la mitad de la más pequeña longitud de onda para capturar importantes detalles de la muestra del proceso. Los resultados sugieren que, para electrodos unipolares extracelulares, un espacio interelectrodo del orden de 1 mm era el apropiado para estudiar la organización durante la FV [Bayly 1993a,b].

La FV ocurre en un medio tridimensional y, aunque existen trabajos en los que se ha abordado su análisis utilizando sistemas tridimensionales [Pogwizd y Corr 1987, Chen et al. 1988,1990], la metodología aplicada es compleja y requiere la inserción de electrodos en las paredes ventriculares que pueden alterar el proceso que se analiza. Así, Chen et al. (1988), mediante 40 electrodos de inserción con múltiples puntos de registro

—configurando 120 registros intramurales en total—, identificaron circuitos reentrantes completos durante la generación de la FV. A pesar de las limitaciones, el análisis del proceso de activación en la superficie de las paredes ventriculares permite describir y conocer con precisión diversos aspectos del proceso de activación global analizado. La observación frecuente de patrones de activación con propagación centrífuga desde el interior del área epicárdica abarcada por el electrodo se interpreta como un indicador de las características tridimensionales del proceso fibrilatorio en el miocardio ventricular [Lee et al. 1996]. La propagación de frentes de activación desde el endocardio hacia el epicardio se traduce en afloramientos del proceso en el área epicárdica analizada, y este fenómeno ocurre con frecuencia al analizar la FV. En los procesos fibrilatorios auriculares ocurre en mucha menor medida, ya que, aunque también influye el carácter tridimensional de las paredes auriculares, predomina la activación según una disposición bidimensional [Allessie et al. 1985, Kirchhof et al. 1993, Konings et al. 1994, Chorro et al. 1999].

Mediante técnicas cartográficas, se han descrito patrones evidentes de activación ventricular reentrante durante la FV, aunque algunos autores comprobaron que la reentrada epicárdica era relativamente infrecuente y de corta duración, sugiriendo que la reentrada sostenida era transmural o que los mecanismos que gobernaban la reentrada sostenida no eran muy importantes en la dinámica de la FV [Rogers et al. 1999]. También observaron que los circuitos reentrantes se hacían más comunes, más grandes y más duraderos conforme la FV progresaba, lo cual podría explicar el incremento observado en la organización de la FV durante su primer minuto. Otros autores han observado que la incidencia de patrones de

activación reentrante es baja, por lo que indican que el proceso fibrilatorio ventricular no parece sustentarse en procesos reentrantes estables y, cuando son objetivados, una de sus características es la limitada duración de los mismos [Lee et al. 1996, Kwan et al. 1998]. Lee et al. (1996) identificaron los patrones de activación reentrante en el estadio II de Wiggers de la FV, y analizaron los mecanismos de terminación y regeneración de estos patrones de activación en un modelo canino, viendo que los frentes de activación (ondas espirales) finalizan por interferencia con otros frentes de ondas o espontáneamente. Huang et al. (1998) cuantificaron los cambios en la activación epicárdica durante los primeros 40 segundos de la FV en un modelo porcino, observando que los patrones de activación están menos organizados a los 10 segundos que a los 0 segundos; posteriormente se van organizando de manera gradual. Davidenko et al. (1992) utilizaron un tinte voltaje-dependiente en combinación con un dispositivo CCD para grabar la actividad eléctrica de láminas de tejido miocárdico de perro y oveja, y demostraron la existencia, en estos modelos, de ondas espirales nómadas. En algunos casos, un único rotor que se desplazaba rápidamente por el tejido era el causante de la actividad caótica observada en el ECG. Otros autores han postulado la necesidad de múltiples rotores para explicar los patrones fibrilatorios del ECG.

Utilizando técnicas de “mapeo”, también son comunes estudios sobre la acción de algunos fármacos en la dinámica fibrilatoria. Así por ejemplo, Kwan et al. (1998), analizaron los cambios en el patrón fibrilatorio producidos por la procainamida, que daba lugar a una disminución en el número de frentes de activación y en el número de veces que se fragmentan los mismos, lo cual contribuiría a la mayor probabilidad de finalización de la

FV. Hillsley et al. (1995), describieron las modificaciones en el patrón fibrilatorio originadas por el propanolol, viendo que disminuye el número de frentes de activación, y por el isoproterenol, que aumenta la cantidad de tejido activado por cada frente.

Chorro et al. (2000a), constataron que tanto el verapamil como la flecainida y el sotalol disminuyen la complejidad de los patrones fibrilatorios, pese a los efectos divergentes del primero respecto de los otros en cuanto a la frecuencia de activación, la longitud de onda y el tamaño de los circuitos reentrantes.

Los sistemas de cartografía con electrodos múltiples, o los sistemas ópticos basados en marcadores sensibles a los cambios de voltaje, han supuesto el soporte metodológico de numerosos trabajos sobre la FV en busca de los mecanismos en los que se sustenta la arritmia. La presencia de reentradas funcionales ha sido demostrada en ventrículos infartados de perros [El-Sherif et al. 1982, Dillon et al. 1988], en tejido ventricular aislado [Davidenko et al. 1990, 1992] y corazones perfundidos [Schaliy et al. 1992]. La activación gira como un remolino, sin un obstáculo central, debido a una menor excitabilidad en su centro de giro que hace la conducción más lenta que en la periferia. El fenómeno puede ocurrir en medios homogéneos —demostrado antes en tejido auricular [Allessie et al. 1973, 1976]—, en contraste con la necesidad de una dispersión de la refractariedad para la reentrada según la hipótesis de ondas múltiples de Moe. Un patrón irregular en el ECG podría ser producido por múltiples rotores simultáneos o por un rotor único con centro de giro migratorio [Jalife and Gray 1996]. Un centro que se desplaza de forma errática es considerado como una destacada característica de los rotores, cuya manifestación bidimensional son las ondas

espirales. Aunque la actividad reentrante puede servir de fuente de activación durante la FV, la generación de estos frentes de ondas depende de la interacción de las ondas. Los nuevos frentes de ondas son generados cuando un frente de ondas interacciona con otro durante su período refractario. Los frentes de onda terminan espontáneamente o como resultado de fenómenos de interferencia.

Estudios cartográficos basados en estos modelos espirales de excitación, o en su expresión tridimensional, han aportado vías distintas de aproximación al estudio de los procesos fibrilatorios, tanto auriculares como ventriculares [Davidenko et al. 1992, Panfilov and Hogeweg 1996, Witkowski et al. 1998], y en ellos se han apoyado diversos trabajos en los que se propone que la evolución de ritmos organizados, como la TV, hacia la FV, ocurre debido a la desestabilización de los patrones de activación reentrante de acuerdo con la "teoría de la restitución eléctrica" [Winfrey 1993, Riccio et al. 1999, Swissa et al. 2002]. En estos estudios experimentales se demuestra que los fármacos que reducen la pendiente de restitución (p.e. la Diacetil Monoxima y el Verapamil) impiden la inducción de la FV y convierten la ya existente en un ritmo periódico. En contraste, los fármacos que no reducen la pendiente de restitución (p.e. la procainamida) no dificultan la inducción de FV. En la misma línea, Cao et al. (1999) aprecian que la interacción de la restitución de la velocidad de conducción y del PRE, produce oscilaciones espacio-temporales en la activación cardíaca, que aumentan de amplitud conforme el ciclo de estimulación disminuye, causando finalmente ruptura de onda y FV. Estos hallazgos, y otros utilizando modelos computerizados, confirman un papel clave de la

restitución de la velocidad de conducción y de la refractariedad en el inicio y el mantenimiento de la FV.

Wu et al. (2002), con una matriz óptica de 100x100 píxeles, examinaron la actividad de un área de 40 mm² de ventrículo de corazón aislado de conejo, concluyendo la existencia de dos tipos distintos de FV dependiendo de las propiedades electrofisiológicas en el momento de su inducción: una FV rápida de difícil remisión con frecuencias dominantes muy elevadas y caracterizada por pequeñas ondas que ambulan erráticamente, y una FV más lenta, con una periodicidad espacio-temporal más marcada. Estudios muy recientes mediante el sistema óptico de “mapeo” [Pak et al. 2003, Wu et al. 2004, Liu et al. 2004], han demostrado que la activación durante la FV se puede caracterizar por la existencia de una frecuencia dominante estable y muy localizada, apuntando además que la ubicación del rotor responsable de la FV tendría que ver con estructuras anatómicas ventriculares (músculos papilares).

Para llevar a término la presente investigación, en la que se pretende estudiar la dinámica de la activación miocárdica en presencia de alteraciones térmicas localizadas, se considera más indicado el empleo de dispositivos electrodo multipolares para obtener los registros. Los argumentos que sustentan esta afirmación se proporcionan en el apartado 1.7.

1.5.7 Estudios basados en simulaciones mediante ordenador

Moe et al. (1962, 1964) plantearon su hipótesis de la reentrada de múltiples frentes de activación para explicar los procesos fibrilatorios, utilizando para ello un modelo computerizado que simulaba el proceso de activación en el tejido miocárdico. Más recientemente, Abildskov (1994) utilizó también un

modelo simulado para aportar datos que complementaban esta hipótesis. Este autor observó que la duración media de los períodos refractarios afectaba la vulnerabilidad de la preparación al modificar el número de respuestas precoces posibles por unidad de tiempo, mientras que la diferencia entre los valores máximo y mínimo de los períodos refractarios afectaba a la falta de uniformidad de la preparación.

Bardou et al. (1995) emplearon simulaciones basadas en un modelo de propagación de la onda de activación a través de la superficie ventricular que incluía áreas localizadas de isquemia, y en este modelo investigaron los efectos de la dispersión de los períodos refractarios. Las simulaciones mostraban que la isquemia era capaz de iniciar fenómenos de reentrada que se propagaban a través del ventrículo en su globalidad. El análisis estadístico de la probabilidad de reentradas en función del tamaño de las zonas isquémicas y de la tasa de dispersión de los períodos refractarios, puso de manifiesto la importancia de este último parámetro.

Qu et al. (1999) analizaron en una lámina bidimensional de tejido cardíaco simulada mediante ordenador, la importancia de la duración del potencial de acción y de la velocidad de conducción en la estabilidad de las reentradas en ondas espirales. Weiss et al. (1999), observando que el proceso de ruptura de la onda espiral en el tejido cardíaco simulado predecía con bastante exactitud la secuencia por la cual una taquicardia degeneraba en fibrilación en el tejido cardíaco real, concluyeron que la modificación del APD y la restitución de la velocidad de conducción pueden prevenir la ruptura de la onda espiral en el tejido simulado, sugiriendo que los fármacos con efectos similares en el tejido cardíaco real podrían tener eficacia desfibrilatoria. Estos autores proponen que la desfibrilación se consigue de

manera más efectiva combinando intervenciones basadas en alterar la restitución del potencial de acción, junto con otras intervenciones antitaquicardia, hechos que podrían servir para desarrollar nuevos fármacos antiarrítmicos [Weiss et al. 1999, Riccio et al. 1999, Cao et al. 1999].

Berenfeld y Jalife (1998) desarrollaron un modelo computerizado tridimensional de ventrículo de mamífero, que incluía el sistema de conducción de Purkinje y las uniones Purkinje-músculo distribuidas en el endocardio. Estos autores simularon la evolución de la actividad reentrante que afectaba al músculo y a la red de Purkinje. Los resultados sugerían que los afloramientos epicárdicos y la actividad endocárdica focal que se detectaban durante la FV podían originarse en la uniones Purkinje-músculo, que la amplitud del ECG podía disminuir al estabilizarse la reentrada y acortarse la longitud de onda del proceso de activación, y que el sistema de Purkinje podía tener un papel doble en la evolución de las reentradas, siendo esencial en los estadios iniciales e irrelevante cuando se establecían las reentradas intramiocárdicas.

La dinámica de las espirales tridimensionales de reentrada y su relación con las diferencias regionales del APD y las variaciones en la restitución, así como su dependencia de la anisotropía tridimensional de las fibras miocárdicas, ha sido objeto de estudio en diversos trabajos recientes con modelos computerizados [Fenton et al. 2002, Wellner et al. 2002, Berenfeld et al. 2003, Xie et al. 2004, Jalife and Berenfeld 2004]. Las simulaciones de la propagación de la activación cardíaca en modelos anatómicos del corazón en los que se contempla la heterogeneidad y la anisotropía de los tejidos sugieren un papel primordial de la dinámica de algunos canales iónicos en la estabilidad y frecuencia de los rotores, pero

también apuntan hacia la geometría de las fibras, que influiría decisivamente en su organización y evolución.

1.6 Influencia de la temperatura

Como se avanzó en el punto 1.1.7 del presente capítulo, las condiciones hipotérmicas o hipertérmicas pueden dar lugar a diferencias apreciables en los patrones de la excitación cardíaca respecto de la situación normotérmica (temperatura basal). Diversos trabajos, utilizando simulaciones por ordenador o preparaciones experimentales, han analizado los efectos de la hipotermia, y en mucha menor medida la hipertermia, en el potencial de acción miocárdico, en la dinámica de las corrientes iónicas que dan lugar a su generación y en la propagación de la activación en el tejido cardíaco.

1.6.1 Efectos a nivel celular

De los trabajos encaminados a analizar los efectos de la hipotermia sobre la electrofisiología del miocardio se deduce que ésta afecta a la cinética de los canales iónicos de las membranas celulares responsables de la activación y recuperación del potencial de acción. Concretamente se sabe que disminuye el potencial de reposo, incrementa la duración de los potenciales de acción ventriculares y prolonga los períodos refractarios [Mouritzen and Andersen 1966, Hoffman and Cranefield 1976, Sprung et al. 1995, Spear and Moore 1998].

Mediante la técnica de fijación del potencial de membrana en miocitos ventriculares de cobaya, Herve et al. (1992) observaron una disminución máxima de 6 mV en el potencial de reposo, y un alargamiento gradual en la duración de la fase de plateau del potencial de acción, al bajar

la temperatura de 36 °C a 12 °C. Estos resultados eran similares a los obtenidos por otros autores [Liu et al. 1991, Bjornstad et al. 1991] que también pudieron registrar un ligero descenso en la pendiente de subida del PA durante la hipotermia aguda. Con modelos similares, Kiyosue et al. (1993) constataron aumentos importantes en el APD al disminuir 10 °C la temperatura, y atribuyeron el retardo en la repolarización a la disminución sufrida en las corrientes iónicas de calcio y potasio. Simulando disminuciones de estas corrientes en modelos matemáticos del PA, se reproducía este efecto de manera aproximada. La diferente sensibilidad a la temperatura de los diversos canales iónicos sería la responsable del enlentecimiento final del PA, pudiendo tener un papel principal el descenso de la corriente diferida de potasio (I_K), y en menor medida la corriente entrante de calcio (I_{Ca}), y la corriente entrante de potasio (I_{K1}) [Herve et al. 1992, Kiyosue et al. 1993, Spear and Moore 1998].

Las alteraciones sufridas por los potenciales de acción dan lugar a variaciones en la propagación del impulso eléctrico a través del miocardio. La refractariedad y la velocidad de conducción del proceso de activación también se ven influenciadas por la temperatura; mientras que la primera se prolonga, la segunda se reduce a medida que disminuye la temperatura [Mortensen et al. 1993, Bjornstad et al. 1994, Ujhelyi et al. 2001]. En cuanto a la longitud de onda, Smeets et al. (1986) observaron que enfriando muestras de tejido auricular hasta 27 °C no se registraban aumentos significativos de este parámetro, ya que el aumento de la refractariedad se veía compensado por la disminución en la velocidad de conducción. Por debajo de esta temperatura, la longitud de onda aumentaba debido a una fuerte prolongación del período refractario funcional.

En el electrocardiograma de superficie, el alargamiento del intervalo QT y el ensanchamiento del complejo QRS son las manifestaciones típicas de las situaciones hipotérmicas [Davis 1993, Mortensen et al. 1993], además de una ralentización del ritmo cardíaco cuando la hipotermia es global.

Al contrario de lo que ocurre con la hipotermia, la hipertermia moderada acorta el potencial de acción e incrementa la velocidad de conducción [Tachibana et al. 1999, Simmers et al. 1995, Nygren et al. 2003].

1.6.2 Arritmogenicidad asociada a la hipotermia/hipertermia

Tanto la hipotermia como la hipertermia se han asociado tradicionalmente a un incremento de la susceptibilidad frente a arritmias ventriculares, y en particular a la fibrilación ventricular [Mouritzen and Andersen 1966, Towne et al. 1972, Eshel et al. 1990, Mortensen et al. 1993, Bjornstad et al. 1994, Ujhelyi et al. 2001]. Durante la hipotermia, este efecto ha sido relacionado con un enlentecimiento en la conducción, un incremento en la dispersión de la repolarización y un aumento en la heterogeneidad de la refractariedad [Salama et al. 1998, Tachibana et al. 1999]. El APD cambia significativamente incluso con ligeras variaciones de temperatura de 1 ó 2 grados centígrados, por lo que un enfriamiento o calentamiento no uniforme del corazón podría generar dispersión en la velocidad de conducción y la refractariedad, creando de esa manera un substrato para reentradas funcionales [Bjornstad et al. 1991].

Una mayor facilidad en la inducción de la FV por electroestimulación durante la hipotermia [Mortense et al. 1993] y durante la hipertermia [Kubota et al. 1988] ha sido puesta de manifiesto en modelos in vivo de perro. Así por ejemplo, Kuo et al. (1983), mediante el calentamiento

regional a 43 °C por perfusión coronaria selectiva de corazones enfriados globalmente a 29 °C, comprobaron que la dispersión en la repolarización facilitaba la inducción de arritmias ventriculares, aplicando estímulos prematuros desde la zona de menor APD. De la misma manera, Tachibana et al. (1999) crearon un modelo experimental de FV fácilmente reproducible, combinando la estimulación prematura programada con el calentamiento y enfriamiento selectivo. Los mapas de activación mostraban la formación de zonas de bloqueo en la frontera de las regiones alteradas sólo cuando el frente de onda procedía de la zona caliente a la normotérmica o de la normotérmica a la fría. Ujhelyi et al. (2001) comprobaron, en un estudio con cerdos, que una bajada de 10 °C en la temperatura corporal resultaba altamente arritmogénica, disminuyendo la velocidad de conducción y prolongando la repolarización ventricular y la refractariedad. Aunque durante la hipotermia el umbral de inducción de la fibrilación disminuía, los requerimientos energéticos de la desfibrilación no eran, sin embargo, mayores que a temperatura basal. Según los autores, lo primero podría deberse a que la hipotermia favorece la desestabilización de los frentes de onda —al disminuir la velocidad de conducción y la excitabilidad y aumentar la dispersión de la refractariedad— mientras que lo segundo se justificaría por el uso de ondas bifásicas y la prolongación que experimenta la refractariedad.

Por otra parte, el enfriamiento del miocardio también ha demostrado curiosamente su capacidad para prevenir o modificar diferentes alteraciones del ritmo cardíaco. En este sentido, se han descrito efectos cardioprotectores de la hipotermia moderada frente a arritmias ventriculares, en modelos experimentales donde se aplica hipotermia tópica localmente [Hale and

Kloner 1999, Schwartz et al. 2001]. La reoxigenación tras la hipoxia, cuando ocurre a unos grados por debajo de la temperatura basal, reduce la incidencia de arritmias ventriculares [Gambassi et al. 1994]. El enfriamiento miocárdico se ha empleado para detener arritmias reentrantes que se habían inducido previamente en preparaciones auriculares aisladas [Smeets et al. 1986], para acortar la longitud del ciclo fibrilatorio auricular [Chorro et al. 1990] y para el tratamiento de arritmias supraventriculares tras intervenciones quirúrgicas [Higashidate et al. 1987, Pfammatter et al. 1995]. Gracias al papel de la hipotermia como reductora de las necesidades metabólicas, su aplicación moderada puede resultar una técnica útil en la limitación del daño isquémico del tejido infartado y la recuperación de la función cardíaca [Hale and Kloner 1999, Miki et al. 1998, Dae et al. 2002], aunque esta aplicación se efectúe después de la isquemia [Schwartz et al. 2001]. También la hipertermia ha demostrado propiedades cardioprotectoras cuando es aplicada con anterioridad al daño isquémico [Yamashita et al. 1998]. En este caso podrían deberse posiblemente a un efecto potenciador de la producción de radicales libres [Arnaud et al. 2002].

Debido a su acción moduladora sobre la electrofisiología cardíaca, las modificaciones controladas de temperatura también pueden constituir una herramienta útil para dilucidar los mecanismos de acción de drogas antiarrítmicas, para crear modelos experimentales de arritmias o para simular condiciones patológicas que facilitan su aparición, tal como sucede en situaciones de isquemia miocárdica o de diversas alteraciones estructurales producidas por estiramiento, fibrosis o cicatrización de zonas del miocardio.

Así por ejemplo, Spear and Moore (1998) estudiaron los efectos arritmogénicos de la quinidina, en un trabajo donde actuaban sobre la

temperatura de perfusión en corazones aislados de conejo. Recientemente, Nishida et al. (2004), en experimentos con corazones de perro in vivo, emplearon un sistema enfriador por circulación de agua fría para rebajar la temperatura local del tracto de salida del ventrículo derecho hasta 30 °C. Esta alteración producía un efecto elevador del punto J (final del QRS) en el ECG, tal y como ocurre con los pacientes afectados por el síndrome de Brugada. Los autores postulaban que este modelo canino de la patología podría simular aspectos electrofisiológicos similares a los que contribuyen a la manifestación clínica del síndrome. Si una anomalía localizada en la zona que aquí se enfriaba fuera el mecanismo de los episodios de FV que suele presentar el síndrome de Brugada, la eliminación del sustrato arritmogénico podría significar la cura. Boersma et al. (2002) también utilizan modificaciones controladas de temperatura para estudiar los mecanismos de una arritmia, la taquicardia ventricular polimórfica. Estos investigadores emplean una sonda enfriadora —también en este caso el sistema para rebajar la temperatura se basa en la circulación de agua fría— para generar, en una fina capa de tejido ventricular perfundido, un gradiente de refractariedad que facilita la inducción de la arritmia (la refractariedad queda prolongada en el centro de la región analizada). En este trabajo se concluyó que un circuito de reentrada funcional desplazándose constituye el mecanismo de la TV polimórfica en un sustrato con un importante gradiente de refractariedad.

1.6.3 Consecuencias en FV

A pesar de la información existente sobre las propiedades arritmogénicas o protectoras de la hipotermia y de la hipertermia, prácticamente no se ha

realizado hasta el momento estudios sistemáticos sobre los efectos de la temperatura en los patrones de la fibrilación ventricular una vez ésta ha sido desencadenada. En este sentido, tan sólo pueden citarse algunos trabajos, como el de Strohmenger et al. (1997). Estos autores, en un estudio donde investigan los efectos de la hipotermia en la frecuencia de la FV —en corazones de pacientes sometidos a operaciones de bypass coronario— analizan la frecuencia mediana del espectro del ECG fibrilatorio, y concluyen que ésta es significativamente mayor durante la perfusión normotérmica que durante la perfusión hipotérmica.

La frecuencia de activación, obtenida como promedio de las frecuencias dominantes (FrD) del análisis espectral de los electrogramas es un parámetro analizado en FV. La información que aporta es en cierto modo análoga a la obtenida con la inversa del intervalo fibrilatorio (VV). En trabajos anteriores realizados en el grupo sobre idénticos modelos, se verificó que ambas están fuertemente correlacionadas ($r=0.919$, $p<0.001$) [Tormos 2006]. Los dos parámetros son representativos de un mismo fenómeno, la frecuencia a la que se activa el tejido ventricular. Uno se obtiene en el dominio del tiempo y otro en el dominio de la frecuencia, y ambos pueden considerarse alternativos.

En el trabajo experimental de Chorro et al. (2002), con modelos de corazón aislado y perfundido de conejo, se analiza el efecto de la reducción aguda y brusca de temperatura sobre el patrón fibrilatorio. En este trabajo, la temperatura de la preparación se reduce mediante la inyección directa de líquido de perfusión frío en el ventrículo izquierdo. Tras el inicio de la perfusión fría, la frecuencia dominante de la FV y la temperatura decaen

exponencialmente hasta la terminación de la arritmia (Figura 1.18), existiendo una correlación lineal entre ambos parámetros.

El cese de la FV ocurre preferentemente en el ventrículo izquierdo, y se relaciona con una importante depresión en la velocidad de conducción, la extinción de frentes de onda y la reducción de la complejidad de los mapas de activación registrados.

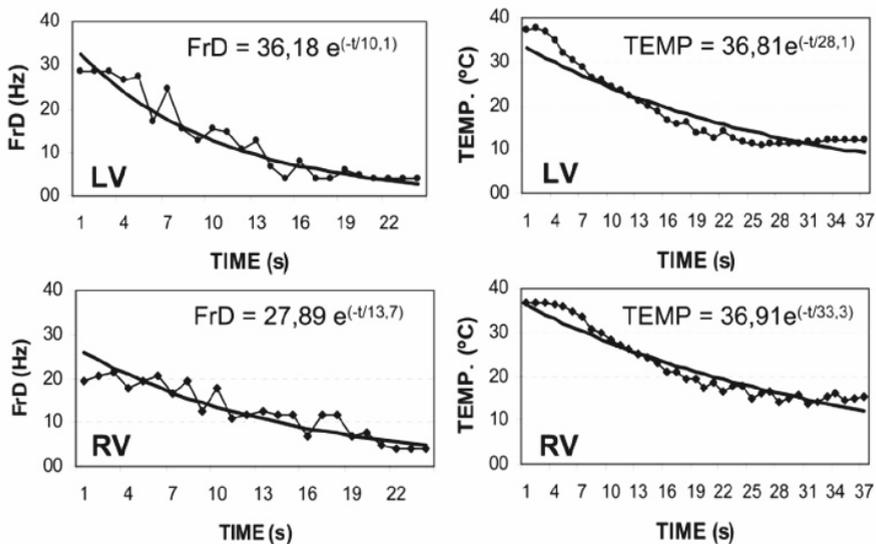


Figura 1.18 Disminución exponencial de la temperatura y la frecuencia dominante de la FV (FrD), en ambos ventrículos, con el enfriamiento agudo y global del miocardio. Los datos de FrD corresponden a un electrodo situado en el ventrículo izquierdo (arriba) o derecho (abajo). Las temperaturas corresponden al epicardio de cada ventrículo. t, tiempo desde el inicio del enfriamiento [obtenido de Chorro et al. 2002a]

1.6.4 Contexto actual y posibles aportaciones

El enfriamiento o calentamiento del miocardio en modelos animales se ha utilizado para la simulación sistemática de arritmias o el síndrome de Brugada [Boersma et al. 2002, Nishida et al. 2004], y para el estudio de las

propiedades de la repolarización [Shkurocich et al. 2000] o mecanismos de determinados fármacos [Spear and Moore 1998]. Además, las variaciones de temperatura, inducidas por diferentes métodos, se han utilizado en varios estudios para evaluar los efectos proarrítmicos o cardioprotectores de esta variable [Arnaud et al. 2002, Harada et al. 2008]. Hasta no hace mucho tiempo, en la mayoría de estos estudios el corazón se enfriaba o se calentaba globalmente con la perfusión [Chorro et al. 2002b, Azarov et al. 2008]. En otros estudios realizados, las alteraciones térmicas estaban localizadas en un área determinada del epicardio y el análisis de sus efectos se efectuaba con electrodos múltiples con resolución espacial limitada [Tachibana et al. 1999, Shkurocich et al. 2000, Boersma et al. 2002, Nishida et al. 2004, Tormos et al. 2008].

La posibilidad de modificar localmente la temperatura del tejido cardíaco de forma precisa con suficiente resolución permitiría ampliar las posibilidades de análisis. Por ejemplo, la desigual sensibilidad que presenta el tejido sometido a cambios de temperatura (heterogenicidad) podría simular patologías que propiciarían la aparición de arritmias. Estas condiciones podrían emular situaciones como las que ocurren en el miocardio con isquemia, o diversas alteraciones estructurales causadas por estiramiento de los tejidos, fibrosis o cicatrices en las áreas del miocardio. Por tanto, las modificaciones electrofisiológicas inducidas por variaciones de temperatura pueden ser útiles para aclarar los diferentes aspectos relacionados con el inicio, perpetuación o cese de las arritmias cardíacas.

Entre las aportaciones potenciales de estos estudios se incluyen las siguientes: (a) la creación de heterogeneidades arritmogénicas que permitan el estudio de los mecanismos implicados en la generación de arritmias

cardiacas, (b) la exploración de los mecanismos de mantenimiento de los procesos fibrilatorios, analizando la repercusión de modificaciones locales sobre el patrón de activación global; (c) la definición de la capacidad de interrumpir los procesos arrítmicos actuando sobre las zonas seleccionadas, y (d) el estudio de los efectos protectores de fármacos u otras intervenciones en condiciones de inestabilidad inducida por los cambios de temperatura local.

Como se ha expuesto anteriormente, no han sido explorados determinados aspectos de la electrofisiología cardiaca y su relación con la temperatura en estudios realizados sobre preparaciones experimentales en las que se aplican modificaciones térmicas localizadas, de ahí subyace el interés principal y el consiguiente planteamiento general de la presente investigación.

1.7 Desarrollo de dispositivos ad hoc

1.7.1 Justificación de la necesidad

En el contexto de las investigaciones realizadas sobre preparaciones de corazón aislado empleando electrodos multipolares, dada la ausencia de elementos estándar comercialmente disponibles, es habitual el desarrollo ex profeso de dispositivos adaptados a las condiciones exigidas por el protocolo experimental y el propio entorno en el que se aplicará [Mastrototaro et al. 1992, Malkin et al. 2000, Sahakian et al. 2001, Rogers et al. 2002, Reppel et al. 2004, Hooks and Trew. 2008, Roy et al. 2009].

En el presente trabajo, se precisaría efectuar modificaciones térmicas localizadas que necesariamente acarrearían el uso de dispositivos en

contacto⁶ con el epicardio ventricular, aspecto éste que en principio haría desestimar el empleo de sistemas de cartografía óptica. De ello derivaría la necesidad de desarrollar un dispositivo que conjugara ambas funcionalidades, la de efectuar el registro eléctrico de una zona y simultáneamente enfriarla o calentarla.

No obstante, muy recientemente otro grupo de investigación ha realizado trabajos similares empleando sistemas ópticos conjuntamente con dispositivos traslúcidos desarrollados al efecto [Yamazaki et al. 2012]. Aunque esta metodología también puede presentar limitaciones por no estar exenta de cierta distorsión en las imágenes derivadas de la refractariedad de la luz al atravesar medios distintos, y también por la dificultad en el control de los cambios de temperatura y su determinación precisa.

1.7.2 Aspectos a considerar

Las citadas condiciones exigibles –que vienen impuestas por el protocolo experimental y el propio entorno– se concretan en las especificaciones o requisitos a satisfacer por el dispositivo para que cumpla con su finalidad, y éstas determinarán por tanto su concepción.

En el presente trabajo, la funcionalidad principal exigible al dispositivo sobre el que se basará la investigación es la de proporcionar registros de suficiente resolución –para obtener mapas de activación– de una determinada área del epicardio ventricular y simultáneamente modificar la

⁶ La transmisión de calor se realiza por conducción, se han desechado alternativas como la convección o radiación por considerarse técnicamente inviables considerando las condiciones a satisfacer.

temperatura de dicha zona de forma controlada entre unos márgenes determinados.

Ejerce un papel determinante el tamaño y la morfología de las preparaciones experimentales empleadas. En el caso de corazones aislados de conejo, sus reducidas dimensiones –a título orientativo similar en tamaño y forma al de una nuez– obligan a buscar una solución que conjugue un diseño miniaturizado y compacto, unido a la viabilidad de su implementación a partir de los recursos disponibles. La morfología del epicardio ventricular –sobre el que se efectuarán los registros– también ha de tenerse en cuenta para favorecer un contacto óptimo entre éste y la superficie de registro. La utilización de materiales biocompatibles garantiza que no se alteran las propiedades de la preparación experimental.

Respecto a la resolución espacial, en el apartado 1.5.6 también se ha hecho referencia a separación entre puntos de registro [Bayly 1993a,b]. El área de registro mínima guardará relación con la longitud de onda de las señales registradas. En la obtención de mapas de activación, ambos aspectos, resolución y área, condicionan el número de canales del dispositivo.

La conectividad del dispositivo –del conjunto de canales– vendrá establecida por las características del sistema de adquisición y registro empleado.

Otro elemento a tener presente es el relacionado con las características térmicas: temperaturas alcanzables, estabilidad, inercia térmica, o la posibilidad de medir dicha temperatura. Vendrán determinadas por la fuente de calor con la que se realice el intercambio térmico –

enfriamiento o calentamiento— entre ésta y la preparación, y también por la conductividad térmica del medio presente entre ambas.

1.7.3 Experiencias previas realizadas

Se dispone de experiencias anteriores en trabajos del propio grupo de investigación [Tormos et al. 2008] en los que se inducían modificaciones térmicas localizadas en el mismo tipo de preparaciones experimentales. En dichos trabajos se utilizaba tecnología *thick-film* en la construcción del electrodo multipolar. Los canales de registro consistían en pistas de material conductor depositadas en una única imprimación sobre un sustrato de alúmina con forma plana. La alúmina es un material cerámico, excelente aislante eléctrico y buen conductor del calor, pero no admite mecanizado (por ejemplo operaciones de taladrado o desbastado). Las características que se tenían eran: 36 canales, separados 1.2 mm entre sí, y un área aproximada de 35 mm². Estas características venían impuestas por restricciones tecnológicas en la fabricación, y daban lugar a que el limitado número de canales y su resolución espacial no permitieran la obtención de mapas con los que estudiar la dinámica de activación. Por otro lado, la forma plana de la alúmina no adaptada a la morfología de la preparación limitaba la zona en contacto con el epicardio. Éstos eran los principales inconvenientes que presentaba y que se aspira a superar en el presente trabajo.

En el referido trabajo se empleó una célula Peltier como elemento regulador de la temperatura. Este sistema de modificación térmica demostró ser eficiente, en tanto que permitía el enfriamiento y calentamiento controlados en el margen de 17 a 42 °C, con un comportamiento dinámico y una capacidad de regulación adecuados para los protocolos empleados

[Tormos et al. 2008]. Los resultados de su aplicación constataron que las alteraciones electrofisiológicas inducidas son reversibles en ese margen, y ya son apreciables con una hipotermia de 5 °C respecto del valor basal de perfusión. Por tanto, no sería imprescindible alcanzar valores tan reducidos de temperatura, siendo más interesante asegurar la reproducibilidad y estabilidad dentro del margen que finalmente se establezca.

1.7.4 Soluciones alternativas

En la realización de dispositivos electrodos multipolares convencionales –sin funcionalidades añadidas como la modificación térmica– es habitual aplicar resina epoxi en un molde. La resina actúa como elemento que aglutina los hilos conductores con los que se realizan los canales. En general, dichas resinas son buenos aislantes eléctricos, permiten el mecanizado –con la consiguiente adaptación de la superficie de contacto a la morfología de la preparación– pero la conductividad térmica es muy baja.

Actualmente existen en el mercado resinas epoxi con las características de conducción térmica mejorada respecto a las convencionales. Con ellas se puede plantear la posibilidad de desarrollar un dispositivo que cumpla con las especificaciones exigidas, empleando en su construcción las técnicas propias de dispositivos electrodos multipolares convencionales, y debiendo adaptarse convenientemente para ser utilizado de forma conjunta con una célula Peltier. De esta forma se buscaría superar las limitaciones que plantea el uso del dispositivo *thick-film* citado en el subapartado anterior, procurando mantener la capacidad de inducir modificaciones térmicas controladas y reproducibles en el epicardio dentro

de unos márgenes de temperatura similares a los referidos en el subapartado anterior.

Los requerimientos o recursos necesarios para el empleo de resinas epoxi no son excesivos, lo que facilita su viabilidad. Además, es un material muy inerte compatible con el entorno experimental. Adicionalmente, con esta técnica se puede plantear la posibilidad de integrar en el mismo dispositivo canales adicionales con electrodos de estimulación e incluso sensores de temperatura.

Para poder llevar a término la presente investigación, se considera oportuno el desarrollo de un dispositivo concebido en base al planteamiento descrito anteriormente, tanto en lo que respecta a aspectos constructivos como a las especificaciones deseables, teniendo presente tanto los condicionantes del entorno como la instrumentación disponible o las características de la propia preparación experimental.

1.8 Parámetros electrofisiológicos a analizar

Las propiedades electrofisiológicas del miocardio desempeñan un papel decisivo en la generación y mantenimiento de las arritmias cardíacas. La activación miocárdica durante la FV se relaciona con los parámetros electrofisiológicos registrados durante la conducción normal o ritmo sinusal, y estos parámetros están modulados por la temperatura [Mortensen 2003, Chorro et al. 2002a]. Del mismo modo, en condiciones de estimulación programada o en FV, también es posible analizar otros parámetros característicos bajo alteraciones térmicas.

A continuación se presentan los parámetros electrofisiológicos cuyo análisis se considera de interés.

1.8.1 Arritmogenicidad. Intervalo QT en ritmo sinusal

La anormal alteración de los intervalos QT [Copie et al. 1997, Goldenberg et al. 2006], tanto en acortamiento [Patel et al. 2010] como alargamiento [Kramer and Zimetbaum 2011], ha demostrado estar asociada a la presencia de riesgos añadidos de arritmias ventriculares malignas [Zayas et al. 2000].

En el electrograma de superficie, el alargamiento del intervalo QT y el ensanchamiento del complejo QRS son manifestaciones típicas de las situaciones hipotérmicas [Davis 1993, Mortensen et al. 1993], además de una ralentización del ritmo cardíaco cuando la hipotermia es global.

Existen muy pocos estudios en los que se analice el efecto de las variaciones localizadas de temperatura sobre este parámetro electrofisiológico, por lo que se ha estimado conveniente su análisis en la presente investigación.

1.8.2 Inducibilidad de la FV en estimulación programada. Determinación de respuestas repetitivas

Una extrasístole –o latido prematuro o ectópico– es una contracción miocárdica previa a la que debiera haberse producido normalmente en un ritmo regular. Se trata por tanto de una arritmia cardíaca, como la taquicardia o la fibrilación ventricular. La presencia extrasístoles ventriculares puede ser el preludeo de la aparición de estas últimas. Algunas extrasístoles ventriculares se deben a mecanismos de reentrada que se originan alrededor de zonas infartadas o isquémicas del corazón. Las estadísticas demuestran

que las personas con cardiopatías estructurales que presentan dichas extrasístoles tienen mayor probabilidad de sufrir una FV espontánea cuyo inicio está precisamente relacionado con dichas extrasístoles [Guyton and Hall 2007].

Cuando se somete al corazón a una situación de estrés, condición que se puede emular experimentalmente mediante estimulación eléctrica programada, la aparición de despolarizaciones espontáneas no provenientes del nodo sinusal ni tampoco de la estimulación externa aplicada, es un indicador de inestabilidad y de mayor probabilidad de inducción de arritmias sostenidas como la FV [Josephson 2001, Zipes 2010].

En estudios clínicos, este tipo de respuestas se relaciona con la aparición de FV. La heterogeneidad en el sustrato electrofisiológico del tejido inducida mediante modificaciones térmicas locales podría facilitar la aparición de dichas respuestas repetitivas.

En la misma línea, cabría pensar que se podría facilitar la inducción de la FV provocando dichas heterogeneidades térmicas, lo que podría aportar información sobre los mecanismos de instauración de la arritmia. Dado que se trata de una cuestión no abordada hasta el momento, se ha considerado procedente su análisis en la presente investigación.

1.8.3 Velocidad de conducción en FV

Durante la FV se produce una actividad eléctrica desordenada en los ventrículos, consecuencia de múltiples frentes de onda simultáneos que despolarizan irregularmente el tejido cardiaco. Tanto la refractariedad como

la velocidad de conducción locales influyen en los patrones de activación durante la arritmia.

Es conocido que la velocidad de propagación del impulso eléctrico en el tejido depende de la temperatura [Chorro et al. 2002a], por tanto cabe esperar modificaciones en los patrones de conducción durante la arritmia si éste se somete a alteraciones térmicas, incluso si éstas son de carácter localizado. Con objeto de dilucidar esta cuestión, se ha encontrado adecuado incluir su análisis en la presente investigación.

1.8.4 Refractariedad y longitud de onda en FV

La estimulación programada –test del extra-estímulo⁷– se puede emplear para la determinación de la refractariedad miocárdica. Sin embargo durante la FV no se pueden aplicar la misma técnica por encontrarse el tejido cardiaco sometido a una actividad caótica, con despolarizaciones y repolarizaciones continuas. En este sentido, se han postulado métodos alternativos para cuantificar la refractariedad local en fibrilación [Duytschaever et al. 2001]. Entre ellos, aquel que asocia el percentil 5 del histograma de intervalos entre activaciones sucesivas (intervalo VV) a un indicador de refractariedad, por estar relacionado tanto con el periodo refractario funcional como con el efectivo [Capucci et al. 1995, Duytschaever et al. 2001]. Esto, unido a la posibilidad de realizar la detección automática de los instantes de activación –referida en el subapartado 1.1.4–, hace que dicho indicador pueda resultar ventajoso para cuantificar la refractariedad frente a otros más complicados de llevar a

⁷ Se define en el subapartado 4.2.2.

término o cuya objetivación resulta más complicada que este método, al margen de resultar un procedimiento de determinación completamente ciego.

En la presente investigación se ha considerado oportuno analizar el percentil 5 de los intervalos entre activaciones en FV, como parámetro indicador de la refractariedad.

A partir del producto entre refractariedad y velocidad de conducción, se puede determinar la longitud de onda y analizar su variación con las modificaciones térmicas locales.

1.8.5 Patrones de activación en FV. Complejidad de los mapas de activación

El trazado de las líneas isócronas sobre los mapas de activación proporciona información sobre la dinámica de la conducción. Dichos trazados se asocian a patrones de activación característicos: frentes de onda simple, afloramientos y reentradas. Así, las líneas isócronas paralelas sobre el mapa indican una transmisión superficial propia de un frente de onda simple, la presencia de curvas cerradas correspondería a afloramientos que se transmiten en profundidad, mientras que las líneas isócronas convergentes en un punto indicarían una reentrada. La identificación de los patrones de activación presentes en un mapa de activación permite su clasificación atendiendo a criterios de complejidad [Konings et al. 1994].

La evaluación de la complejidad durante la arritmia implica la obtención y análisis de mapas de activación de la zona térmicamente alterada y de la distante a ésta. En trabajos previos [Chorro et al. 2002a] se demostró que, en condiciones de hipotermia global, el cese de la FV venía precedido de una reducción significativa de la complejidad de los mapas. Sin embargo

no han sido explorados los efectos del enfriamiento o calentamiento locales sobre la complejidad del patrón fibrilatorio.

Cabría pensar que la hipotermia local tendería a reducir la complejidad de la FV, al menos en la zona afectada. No obstante la heterogeneidad creada por la actuación local podría tener un carácter arritmogénico, provocando así el efecto opuesto [Han and Moe 1964]. Los resultados obtenidos de estos análisis podrían aportar información en relación con los mecanismos de mantenimiento de la FV, dada la controversia existente actualmente sobre los mismos [Panfilov and Pertsov 2001, Nash et al. 2006], por lo que se ha considerado pertinente su inclusión en la presente investigación.

1.8.6 Reversión de la FV

En investigaciones previas se consiguió revertir la FV mediante la disminución brusca de la temperatura de perfusión [Chorro et al. 2002a]. Por otra parte, en trabajos en los que la actuación era de carácter local, no se consiguió el cese de la arritmia [Tormos et al. 2008].

En el contexto de la presente investigación, resulta interesante plantear otros procedimientos alternativos de enfriamiento selectivo dirigidos a alcanzar la reversión de la FV. Estaría por explorar los efectos asociados a un enfriamiento selectivo y gradual del epicardio. Su realización podría plantearse mediante la aplicación directa de elementos termoeléctricos [Tormos et al. 2008], o a través de la inmersión gradual de la preparación en un baño de Tyrode a temperaturas suficientemente reducidas.

En este caso los resultados obtenidos podrían relacionarse con dos cuestiones objeto de debate. La primera de ellas está relacionada con la masa crítica necesaria para mantener la actividad fibrilatoria ventricular. El enfriamiento de una cantidad suficiente de tejido hasta el punto de deprimir la conducción y alargar la refractariedad de manera intensiva podría llegar a detener la arritmia. La segunda está vinculada con una de las teorías vigentes sobre la FV, aquella que atribuye un papel protagonista a un foco reentrante de alta frecuencia que sería el responsable del mantenimiento de la arritmia [Jalife 2000]. Si la zona de aplicación de hipotermia aguda coincidiera con la zona de instauración del foco, se podría ralentizar su dinámica y ayudaría a la extinción de la FV.

Con objeto de esclarecer estas cuestiones, parece acertado analizar la capacidad de modificar la perpetuación de la FV mediante alteraciones epicárdicas de ámbito local (aisladas o múltiples) o bien globales.

1.8.7 Esbozo de protocolos experimentales

Con lo que se ha presentado en el presente capítulo, parece interesante plantear protocolos experimentales basados en preparaciones de corazón aislado de conejo, que contemplen diferentes situaciones funcionales –ritmo sinusal, estimulación programada y FV–, combinados con variaciones graduales de temperatura localizadas en una zona del epicardio ventricular entre ciertos márgenes, que permitieran la obtención simultánea de información de la zona térmicamente modificada y de otra también ventricular y distante de ésta.

Los protocolos basados en dicho planteamiento permitirían realizar registros con los que obtener los parámetros electrofisiológicos descritos

anteriormente en dos zonas diferenciadas del epicardio ventricular (una modificada térmicamente y otra no modificada), bajo distintas situaciones funcionales a diversas temperaturas. Con ello se podría comparar los efectos de las modificaciones localizadas de temperatura sobre dichos parámetros y analizar las diferencias observadas.

Capítulo 2. **Objetivos**

En el Capítulo 1 se realizó una recopilación estructurada de conocimientos extraídos de la literatura científica. Se pretendió entonces: i) esbozar el estado actual de la electrofisiología cardiaca y la contribución de la investigación experimental en la profundización de su conocimiento con la consiguiente implicación clínica de sus avances, ii) apuntar algunas carencias observadas que han servido para plantear el presente trabajo, y en ese sentido iii) identificar algunos aspectos que merecen atención y cómo se podría abordar su estudio. En consecuencia, la citada argumentación contextualiza la presente investigación y contribuye a perfilar sus características principales de una forma preliminar. En el presente capítulo se declara el interés general en base a aquellos argumentos, y en consecuencia se justifica su realización en los términos expuestos. En este capítulo también se pretende definir con mayor detalle la investigación: i) concretando las hipótesis planteadas que la han inspirado, ii) determinando los objetivos marcados para dar respuesta a las mismas, iii) delimitando la metodología a emplear, iv) estableciendo el plan de trabajo a seguir y v) revisando los recursos disponibles, mostrando así su conveniencia y viabilidad.

Índice del capítulo

2.1 Justificación de la investigación.....	83
2.2 Hipótesis.....	84
2.3 Objetivos de la investigación	85
2.4 Metodología	86
2.5 Plan de trabajo	87
2.6 Recursos	88

2.1 Justificación de la investigación

La presente investigación guarda relación con el estudio de la FV, que es la principal arritmia causante de muerte súbita cardiaca, como se vio en el apartado 1.2. En el subapartado 1.2.3 se argumentó la necesidad de avanzar en el conocimiento de la arritmia para progresar en la prevención o en su interrupción inmediata una vez aparecida. En el subapartado 1.5.1 se citaron algunos trabajos sobre diversos aspectos concretos de la FV que se encaminaban a esclarecer sus mecanismos. De modo que todo ello, por un lado contribuye a contextualizar el presente trabajo, y por otro pone de relieve la importancia de la investigación experimental en el campo de la electrofisiología cardiaca y su papel en el desarrollo de técnicas de diagnóstico en la prevención y en el tratamiento de las arritmias cardiacas.

Entrando en mayor detalle, en el apartado 1.6 se presentó cómo se ve afectada la electrofisiología cardiaca por esta variable, y en el subapartado 1.6.4 se citaron investigaciones recientes y algunas de sus limitaciones, que por un lado dan pie a plantear la presente investigación, y de forma simultánea la concretan en aspectos relativos a la realización de modificaciones térmicas localizadas y la obtención de registros electrocardiográficos con objeto de estudiar la dinámica de la activación ventricular.

Sobre cómo llevar a término la investigación, en el subapartado 1.5.1 se habló del interés de estudiar parámetros electrofisiológicos obtenidos a partir de registros extracelulares, en el 1.5.2 de la adecuación de la especie al presente estudio. Por razones de experiencia del propio grupo de investigación y por la adaptación de los recursos materiales disponibles se manifestó la conveniencia de trabajar con conejos, con las implicaciones

legales que ello conlleva. En el subapartado 1.5.3 se presentó el Sistema Langendorff como un soporte metodológico con una dilatada trayectoria que permanece plenamente vigente, mostrándose idóneo para llevar a término el presente estudio. En el subapartado 1.7.1 se razonó sobre la conveniencia de desarrollar ex profeso un dispositivo electrodo que conjugue la capacidad de permitir registros de suficiente resolución espacial y simultáneamente modifique la temperatura de la zona de contacto. En el subapartado 1.7.4 se propuso una determinada concepción del dispositivo.

Sobre los aspectos objeto de estudio, en el apartado 1.8, se mostró el interés concreto de cada uno de ellos: análisis del intervalo QT, determinación de respuestas repetitivas, y durante la FV: análisis de la velocidad de conducción, de la refractariedad, de la complejidad de los mapas de activación y de la reversión de la arritmia. Finalmente en el subapartado 1.8.7 se propuso el planteamiento de un protocolo experimental para abordar la presente investigación.

Por todo ello, se ha encontrado procedente y plenamente justificado proponer la presente investigación con la finalidad de estudiar el papel de la temperatura sobre determinados parámetros electrofisiológicos miocárdicos y así superar algunas limitaciones que presentaban trabajos anteriores, o explorar aspectos no abordados hasta el momento. Todo ello con la convicción de que las aportaciones al respecto constituirán un avance en el conocimiento del campo científico.

2.2 Hipótesis

Con el esbozo expuesto anteriormente y teniendo presente el estado actual del conocimiento en el tema, se considera razonable plantear las siguientes hipótesis:

- (a) Dado que la temperatura modifica las propiedades electrofisiológicas del miocardio ventricular, cabe esperar que las alteraciones locales de la temperatura epicárdica conduzcan a la aparición de heterogeneidades en la activación eléctrica del tejido.
- (b) En ciertas condiciones, estas heterogeneidades podrían facilitar la inducción de FV.
- (c) Cuando la arritmia ya está instaurada, la hipotermia/hipertermia local podría modificar la complejidad de la activación,
- (d) incluso la reducción aguda de la temperatura local podría conducir a la reversión de la arritmia si la masa enfriada fuera de suficiente extensión.
- (e) Para efectuar este tipo de estudios sería necesario obtener registros de suficiente resolución espacial simultáneamente con la modificación local de la temperatura, la combinación de un dispositivo termoeléctrico con un electrodo cableado en molde de resina epoxi de alta conductividad térmica podría proporcionar esta doble funcionalidad (modificación térmica y registro de suficiente densidad).

2.3 Objetivos de la investigación

Con el propósito de comprobar las hipótesis anteriores se plantean los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un dispositivo electrodo multipolar cuyos registros permitan la obtención de cartografía eléctrica epicárdica con capacidad de modular la temperatura local (hipotermia/hipertermia), para ser utilizado en estudios electrofisiológicos con corazón aislado de conejo. El sistema deberá validarse experimentalmente comprobando la capacidad de registrar mapas de activación epicárdica a temperaturas estables superiores e inferiores al valor basal de perfusión.
2. Con el dispositivo desarrollado, estudiar en el modelo experimental los efectos que causan las modificaciones locales de la temperatura sobre determinadas características electrofisiológicas del miocardio ventricular. En particular se pretende cuantificar cómo afecta a:
 - el intervalo QT,
 - la aparición de respuestas repetitivas e inducibilidad de la FV mediante estimulación programada,
 - la velocidad de conducción, la longitud de onda, el intervalo fibrilatorio, la refractariedad durante la FV, y
 - la complejidad de los patrones de activación de la FV.
3. Explorar procedimientos encaminados a revertir la FV mediante enfriamiento progresivo y selectivo del modelo experimental.

2.4 Metodología

Los argumentos expuestos en el apartado 2.1, en especial aquellos relativos a cómo realizar la investigación y qué aspectos investigar, dan soporte a la metodología que se propone: i) la investigación se basará en un modelo

experimental de corazón aislado de conejo, ii) se desarrollará a tal efecto para su posterior utilización un dispositivo electrodo multipolar capaz de modificar localmente la temperatura epicárdica ventricular, y cuyos registros permitan realizar estudios electrocartográficos, se procederá a su validación; iii) el principio general del protocolo experimental a aplicar en las series experimentales consistirá en realizar, con el dispositivo desarrollado, modificaciones térmicas locales controladas –de forma gradual y acotada–, y mediante el uso de otro dispositivo auxiliar convencional, efectuar registros en sendas zonas del ventrículo, una térmicamente modificada y otra no modificada; iv) a partir de los registros obtenidos se analizarán determinados parámetros que permitirán la comparación entre ambas zonas, y v) con ello se podrán obtener conclusiones acerca de los efectos electrofisiológicos de las variaciones localizadas de temperatura en el miocardio. La búsqueda de la reversión de la FV mediante la aplicación progresiva y selectiva de frío exigirá una variación del planteamiento anterior, de modo que vi) se propondrán para su consecución otros procedimientos concretos alternativos a los anteriores.

2.5 Plan de trabajo

El plan de trabajo propuesto para llevar a término la investigación consistirá en:

1. El diseño y construcción de un electrodo para cartografía eléctrica epicárdica con capacidad moduladora de la temperatura con el propósito de ser utilizado en estudios electrofisiológicos con corazón aislado de conejo.

2. La evaluación funcional del electrodo sobre preparaciones experimentales.
3. El diseño de un protocolo experimental con el que someter a la preparación experimental a una variación de temperatura gradual en condiciones de ritmo sinusal, bajo estimulación programada y en FV, registrando las señales de las que se obtendrán los parámetros de interés.
4. La realización de una serie de experimentos siguiendo el protocolo anterior.
5. El análisis de parámetros electrofisiológicos a partir de los registros obtenidos en la serie experimental.
6. El diseño de un protocolo orientado a conseguir la reversión de la FV en la preparación experimental mediante aplicación progresiva y selectiva de frío. Realización de una serie de experimentos y análisis de resultados.

2.6 Recursos

Para la realización de los trabajos referidos en el apartado anterior se cuenta con el Laboratorio del grupo BIO del instituto universitario ITACA de la Universitat Politècnica de València (UPV) y con el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València (UV). En éste último se realizarán todos los trabajos que implican la ejecución de protocolos experimentales que corresponden a los puntos 2, 4 y 6 del apartado anterior, mientras que en el laboratorio de la UPV se realizarán el resto de tareas. El carácter multidisciplinar del presente trabajo requerirá del apoyo y la colaboración del equipo de fisiólogos y cardiólogos

de la UV, y de los ingenieros de la UPV que conforman el grupo de investigación. Dicha colaboración ya se ha materializado en los últimos años en forma de proyectos de investigación y publicaciones realizados conjuntamente, habiéndose visto reforzada con el reconocimiento como Microclúster de Investigación denominado “PROTECCIÓN CARDIOVASCULAR” dentro del programa VLC/CAMPUS.

En cuanto a los recursos disponibles en dichos laboratorios, por un lado en el Laboratorio de Fisiología se dispone de un sistema Langendorff con la instrumentación necesaria para el registro y estimulación y está atendido por personal técnico competente, a lo que hay que añadir la proximidad del animalario para abastecer de ejemplares. Todo ello hace que dicho laboratorio sea idóneo para llevar a término la investigación en su parte experimental. En lo que respecta al Laboratorio del grupo BIO se dispone de los recursos necesarios para la realización de dispositivos específicos y para el análisis de los datos registrados, así como personal competente al cargo del mismo, por lo que también se considera idóneo para la realización de dichos trabajos.

Respecto a la financiación necesaria para acometer la investigación, será en gran parte sufragada por fondos públicos provenientes de diferentes organismos y cuyo código de las respectivas ayudas se detalla: Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciència (GV06/125), Ministerio de Educación y Ciencia (DEP2006-56208-C03), Ministerio de Sanidad (RETIC REDINSCOR RD06/0003/0010) y Generalitat Valenciana (PROMETEO 2010/093).

De lo expuesto se considera perfectamente viable y conveniente emprender la presente investigación.

Capítulo 3. **Desarrollo del dispositivo electrodo**

En el Capítulo 1 se argumentó la necesidad de realizar un dispositivo electrodo multipolar para acometer la investigación. Se expusieron entonces los diferentes aspectos a considerar y se concretó una propuesta. En el Capítulo 2 se enunció la necesidad del desarrollo y se formuló una hipótesis sobre su viabilidad, constituyendo así uno de los objetivos de la presente investigación. En el presente capítulo se describe el desarrollo del dispositivo electrodo multipolar y su caracterización. Se estructura en cuatro apartados. En el primero se presentan los aspectos concretos que han condicionado la concepción del dispositivo. En el segundo se detallan los elementos involucrados en sus capacidades térmicas. En relación con el electrodo propiamente dicho –elemento fabricado sobre un molde de resina epoxi que alberga los hilos que constituyen los canales de registro–, en el tercer apartado se describe su concepción, realización, conexionado y comprobación funcional. En el cuarto y último apartado se describe la caracterización del dispositivo, el protocolo experimental seguido con tal fin, y las características que se han determinado.

Índice del capítulo

3.1 Condicionantes y requisitos a satisfacer.....	95
3.2 Sistema térmico	97
3.2.1 Célula Peltier	97
3.2.2 Elementos refrigerantes	99
3.3 Electrodo	99
3.3.1 Concepción.....	101
3.3.2 Conexionado.....	103
3.3.3 Realización	105
3.3.4 Comprobación funcional	106
3.4 Caracterización del dispositivo desarrollado.....	106
3.4.1 Protocolo experimental	106
3.4.2 Comportamiento dinámico de las variaciones térmicas	107
3.4.3 Profundidad de actuación epicárdica.....	108
3.4.4 Distribución de temperatura epicárdica.....	109

En el apartado 2.5 se presentaron las tareas a realizar. Entre ellas se tiene por un lado el diseño y construcción del dispositivo electrodo multipolar con capacidad moduladora de la temperatura descrita en los apartados 3.1 a 3.3, y con un carácter más experimental las tareas correspondientes a la evaluación funcional del electrodo sobre preparaciones experimentales, descrita en el apartado 3.4. Las primeras a realizar en el Laboratorio del grupo BIO de la UPV, y las de carácter experimental en el Laboratorio de Fisiología de la UV.

3.1 Condicionantes y requisitos a satisfacer

La funcionalidad principal exigida al dispositivo a desarrollar es la de proporcionar registros de la actividad eléctrica en una zona del epicardio ventricular, y simultáneamente modificar la temperatura de dicha zona. La resolución espacial de dichos registros debe ser suficiente para permitir registros electrocardiográficos con los que obtener mapas de activación. De forma adicional debe permitir la medida de la temperatura del epicardio y posibilitar la aplicación de estímulos eléctricos en la misma zona de registro. En cuanto al margen de temperaturas se tendrán presentes las consideraciones expuestas al final del subapartado 1.7.3.

Las dimensiones y morfología de la preparación experimental condicionan de forma determinante las características del dispositivo. Efectivamente, dado que éste debe adecuarse a: i) su reducido tamaño –un corazón de conejo no es mayor que una nuez–, y ii) a la superficie del epicardio –asimilable a una cuchara o elipsoide, y con la que debe establecer un perfecto contacto para que tenga lugar el registro.

En lo que respecta al conexionado, es importante tener presente la elevada densidad de canales de registro que se requiere al dispositivo – inherente a la capacidad de permitir la obtención de mapas de activación– y la compatibilidad con el sistema de adquisición existente en el laboratorio *MapTech* –descrito en el subapartado 4.1.3. Adicionalmente para reducir los niveles de ruido por interferencias electromagnéticas en las señales registradas habrá que apantallar de forma conveniente.

En vista de los anteriores condicionantes, se ha optado por satisfacer los requisitos planteados mediante una concepción modular del dispositivo. De modo que éste esté constituido por dos partes, por un lado el sistema térmico que integra todos los elementos que tienen que ver con la correspondiente funcionalidad. Y por otra parte, el electrodo propiamente dicho, que incluiría lo relativo al registro de electrogramas y las funcionalidades adicionales de estimulación y medida de la temperatura.

De forma adicional a los requisitos enumerados anteriormente, con la concepción modular del dispositivo se consigue el poder reemplazar las partes del mismo en caso de avería o deterioro de una de ellas, o para mejorar sus prestaciones en un futuro.

En el diseño y posterior implementación se ha procurado en la medida de lo posible evitar el uso de tecnologías sofisticadas, generalmente caras y de difícil acceso –siempre que ello no estuviera suficientemente justificado– recurriendo al empleo de elementos estándar comercialmente disponibles con los que se reducen costes sin que suponga una merma sustancial de prestaciones.

3.2 Sistema térmico

El elemento activo que aporta el frío o calor necesario para provocar las alteraciones térmicas locales en la preparación experimental es una célula Peltier. Ésta funciona conjuntamente con otros elementos cuyo propósito es disipar el calor extraído por la célula y mejorar así su rendimiento, estos últimos son: un bloque de refrigeración, una bomba centrífuga, líquido refrigerante, conductos flexibles y vaso de expansión.

3.2.1 Célula Peltier

Con este elemento se producen las alteraciones térmicas controladas, tanto calentar como enfriar desde su valor basal (37 °C). Este refrigerador termoeléctrico es un dispositivo de estado sólido cuyo funcionamiento se basa en el efecto Peltier (*Figura 3.1*). Los módulos comerciales consisten en múltiples pares de uniones o termoelementos de semiconductor p y semiconductor n , conectados eléctricamente en serie y térmicamente en paralelo. Dos placas de material cerámico conforman y aíslan la "cara fría" y la "cara caliente" del módulo. Como material semiconductor suele emplearse el telururo de bismuto (Bi_2Te_3).

El dispositivo actúa como una bomba térmica, transfiriendo continuamente calor de la cara fría a la caliente, de manera proporcional a la corriente inyectada. En la medida en que el calor acumulado en la cara caliente pueda ser disipado, se dispondrá de un sistema eficaz para reducir la temperatura de la cara fría, y por tanto la de aquel material al que se encuentre en contacto térmico, en este caso el electrodo. Al invertir el sentido de la corriente, se intercambia el comportamiento térmico de las caras.

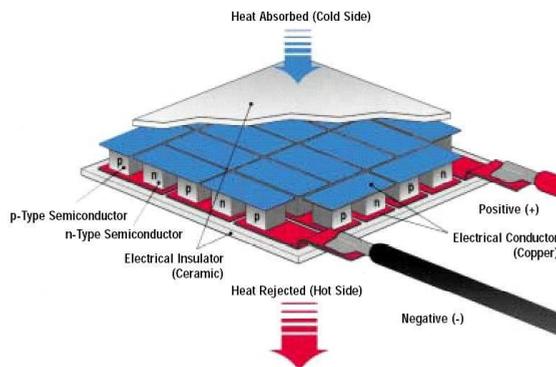


Figura 3.1 Estructura de un refrigerador termoeléctrico

Las células Peltier tienen una baja eficiencia energética, pero no es éste un factor primordial en esta aplicación. Por contra, destacan las características relativas al tiempo de respuesta, sus reducidas dimensiones o la posibilidad de control de la temperatura. Al margen de poder enfriar y calentar con el mismo dispositivo, simplemente invirtiendo el sentido de la corriente.

La célula empleada es el modelo *PE-127-10-08-S*, de la firma *Supercool*[®]. Es uno de los pocos modelos herméticos para condiciones húmedas que se encuentran actualmente en el mercado. La estanqueidad se consigue mediante un sellado perimetral del refrigerador que evita que la humedad o los vapores entren en contacto con las uniones termoeléctricas o los conductores, condición indispensable en este caso ya que el líquido de perfusión acaba empapando completamente la superficie del dispositivo. Tiene las siguientes características: dimensiones 30 x 30 x 3.1 mm, Sus características eléctricas de corriente, tensión y potencia máximas son

respectivamente: 6 A; 15.7 V y 57.1 W; y gradiente térmico máximo entre caras de 72 °C.

3.2.2 Elementos refrigerantes

En contacto con la cara caliente de la célula, con objeto de evacuar el calor que en ella se produce y reducir el gradiente térmico entre caras, se dispone de un bloque refrigerador fabricado en cobre y recubierto de níquel, modelo *SNB-N*, de la firma *Chipset Alphacool*[®], presenta una eficiencia máxima en un volumen muy reducido dada la elevada conductividad térmica del cobre (385 W/mK). Sus dimensiones son 40 x 40 x 15 mm, tiene la entrada y salida de líquido refrigerante para tubo flexible de G1/4”.

A través del refrigerador circula una solución de agua y etilenglicol a temperatura inicial de -10°C, mediante un circuito cerrado compuesto por tubos de silicona, una bomba y un vaso de expansión. Los tubos de silicona tienen un diámetro exterior 8 mm y 1 mm de grosor, en el montaje se recubren de otro tubo auxiliar de material aislante para reducir las pérdidas. La solución de etilenglicol se impulsa mediante una bomba centrífuga de potencia de salida 10 W y flujo máximo 14 litros por minuto. El vaso de expansión consiste en un cubo de polietileno expandido que aísla térmicamente el líquido refrigerante del ambiente evitando pérdidas.

3.3 Electrodo

El electrodo alberga los elementos que intervienen en el registro de los electrogramas, así como en otras funcionalidades adicionales como la estimulación local y la medida de temperatura. Está construido en resina epoxi, tiene un espesor reducido, una de sus caras es perfectamente plana y

está en contacto con la célula Peltier, lo que favorece la transmisión de calor por conducción. La otra cara del electrodo está en contacto con el epicardio, por lo que adopta una forma convexa similar a la de una cuchara.

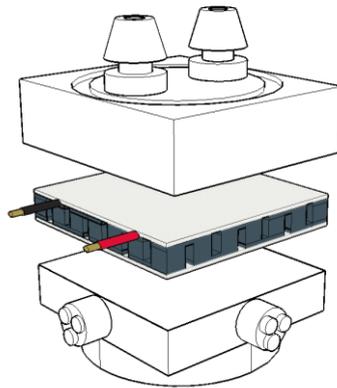


Figura 3.2 Partes del dispositivo desarrollado. Bloque refrigerador en la parte superior con la entrada y salida de líquido refrigerante, bajo ésta la célula Peltier, y por último el electrodo, cuya superficie inferior (oculta en la figura) es la de registro en epicárdico.

La *Figura 3.2* muestra una perspectiva esquemática del conjunto. En la parte superior aparece el refrigerador, con los conductos de entrada y salida de refrigerante, en la parte inferior el electrodo, y entre ambos, en color más oscuro, la célula Peltier. Aunque se han representado los tres elementos con cierta separación entre sí, todos están en íntimo contacto. En el ensamblado se utiliza silicona térmica para favorecer la transferencia de calor, por conducción, entre estos elementos.

3.3.1 Concepción

Se ha ampliado la funcionalidad de los dispositivos electrodo desarrollados por el grupo de investigación en experiencias previas –se describe en subapartado 1.7.3, [Tormos et al. 2008]– optando por integrar 128 canales unipolares espaciados 1 mm entre sí, y dispuestos en una matriz cuya distribución de puntos de registro sobre la superficie de contacto con el epicardio se representa en la *Figura 3.3*, que cubren un área próxima a 100 mm². La resolución de registro y el área abarcada son suficientes –se trata en los subapartados 1.5.5 y 1.7.3, [Bayly 1993a,b]– para la realización de mapas de activación ventricular durante la FV a partir de las señales obtenidas, lo que supone superar una de las limitaciones que se tenían en las experiencias previas [Tormos et al. 2008], en las que se habían conseguido matrices de 6 x 6 puntos de registro interespaciados 1.2 mm entre sí que cubrían 35 mm². Los hilos empleados lo que no permitía la obtención de mapas de suficiente calidad.

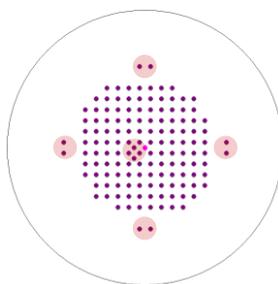


Figura 3.3 Distribución de puntos de registro y estimulación

Los cinco pares de puntos encerrados en pequeños círculos sombreados de la *Figura 3.3*, corresponden a canales de estimulación bipolares. El punto representado en el centro corresponde a un termopar tipo K (marca RS, código 621-2158) empleado para el registro de la temperatura epicárdica.

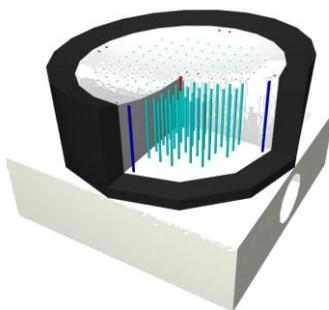


Figura 3.4 Detalle de la constitución del electrodo

El elemento que alberga: i) los hilos que conforman los canales de registro, ii) los hilos de los canales de de estimulación y iii) el termopar es un compuesto epoxídico de la firma *Electrolube*[®], su denominación comercial *ER2074*, de conducción térmica 1,265 W/mK, mejorada respecto a la de las resinas epoxi estándar que está en torno a 0,55 W/mK. La justificación de su elección radica en la compatibilidad con el entorno de investigación (altamente inerte), la necesidad de una conducción térmica aceptable, la posibilidad de mecanizado con objeto de adaptar la superficie de contacto del electrodo a la morfología del epicardio en la zona ventricular, y un buen aislamiento eléctrico. Los hilos empleados para los canales de registro y de estimulación son de acero inoxidable AISI 316,

conector que agrupa los canales de estimulación y, en el otro dos conectores para los termopares. En la *Figura 3.5* se representa esquemáticamente todos los elementos descritos y su interconexión.

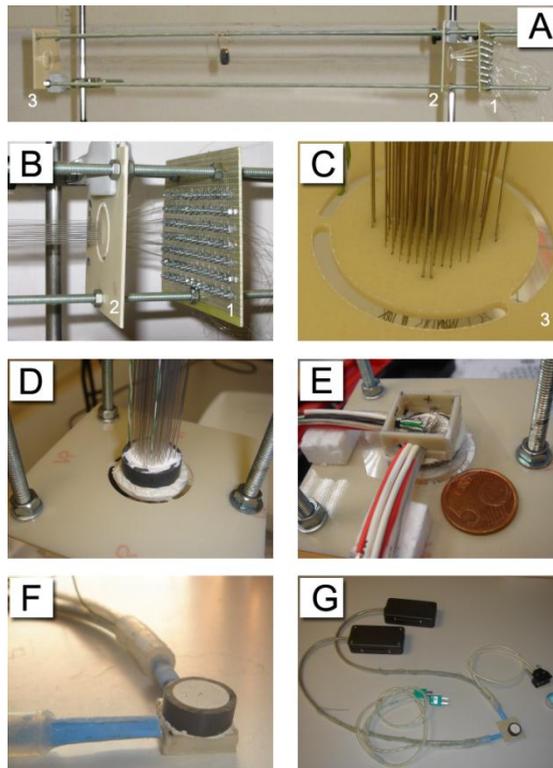


Figura 3.6 Fotografías durante la fabricación. A, estructura auxiliar para el posicionamiento de hilos. B, planchas para el guiado de hilos. C detalle del guiado. D, aplicación de la primera fase de resina líquida sobre la plancha auxiliar y el anillo. E, agrupación de hilos y molde para la aplicación de la segunda fase de resina líquida. F, detalle de la cara de registro del electrodo – previo al mecanizado. F, aspecto final del conjunto.

3.3.3 Realización

La fabricación del electrodo es un proceso laborioso que consta de varias fases: alineación de hilos, preparación de la pasta de relleno, construcción del molde, agrupación de hilos en mazos, apantallamiento, aislamiento y conexionado de los cables al conector, mecanizado y pulido de las superficies. La ejecución cuidada de cada una de ellas es imprescindible para garantizar un resultado final robusto y libre de interferencias. En la *Figura 3.6* se muestran algunas fotografías que ilustran la secuencia del proceso de fabricación.

El compuesto epoxídico se aplica en dos fases (fotografías D y E). La primera requiere previamente el posicionamiento preciso de todos los hilos, 139 en total, lo que se resuelve empleando una estructura auxiliar fabricada al efecto (fotografía A). Esta estructura consiste en tres varillas roscadas que soportan tres planchas, teniendo éstas últimas como objeto mantener el guiado y la tensión de los hilos. Se precisa pasar uno a uno todos los hilos (fotografías B y C). Se dispone de un molde con forma anular de 20 mm de diámetro exterior, 2 mm de grosor de las paredes y 6 mm de espesor, que contiene la resina líquida hasta que fragua (fotografía D), y corresponde con la parte superior de la *Figura 3.4*, en color oscuro. Una vez encapsulados se confeccionan los mazos de hilos y se utiliza otro molde, ahora con forma de lámina cuadrada, de 20 mm de lado y 6 mm de espesor, aplicándose a continuación la segunda fase de resina epoxi (parte inferior de la *Figura 3.4* y fotografía E). El mecanizado de la superficie de contacto con el epicardio (la zona del molde anular) se realiza con una muela o fresa de forma oval o de gota para taladro de miniatura, siendo la profundidad máxima del mecanizado de 1,7 mm. La cara opuesta del electrodo (la zona

del molde cuadrado) se pule para favorecer el contacto con la superficie de la célula Peltier. La fotografía F muestra el electrodo a falta del mecanizado, y la G y el conjunto con mazos y conectores.

3.3.4 Comprobación funcional

Una vez construido el dispositivo se procedió a realizar una verificación funcional previa en la que se comprobaron las capacidades eléctricas y térmicas del dispositivo. Se realizó sobre tres preparaciones, el sistema experimental empleado fue el descrito en los subapartados 4.1.2 y 4.1.3.

3.4 Caracterización del dispositivo desarrollado

3.4.1 Protocolo experimental

Con objeto de evaluar la capacidad modificadora del dispositivo desarrollado, los efectos térmicos sobre la preparación y sus limitaciones, se realizó una serie de experimentos siguiendo unos protocolos específicos.

Se ubicó la preparación en el Sistema Langerdorff según se describe en el subapartado 4.1.1. Se dejaron transcurrir veinte minutos, tiempo durante el cual se situaron sobre la preparación los elementos de registro y estimulación referidos en el subapartado 4.1.2, conectándolos a su vez a la correspondiente instrumentación descrita en el subapartado 4.1.3, comprobando el correcto funcionamiento del conjunto.

Se comprobaron los márgenes de temperatura alcanzables y su reproducibilidad, en especial la temperatura mínima. Su determinación empírica fijó el escalón mínimo en los protocolos experimentales planteados en el presente trabajo. La temperatura máxima se fijó en 42 °C para evitar

lesiones irreversibles en la preparación. Según el protocolo concreto, la temperatura se modificó entre dicho margen en escalones¹ de 5 °C.

En la realización de los protocolos, partiendo de la situación basal, correspondiente a la temperatura de perfusión (37°C), se modificó la temperatura epicárdica mediante la regulación manual de la corriente eléctrica aplicada a la célula Peltier hasta alcanzar las temperaturas que se indican en cada caso.

Las características analizadas fueron el comportamiento dinámico de las variaciones térmicas, el alcance de las modificaciones térmicas en la pared ventricular y la distribución térmica epicárdica.

3.4.2 Comportamiento dinámico de las variaciones térmicas

Ésta característica se obtuvo a partir de las curvas tiempo-temperatura en las medidas correspondientes a los escalones 37 °C / 22 °C, 22 °C / 37 °C y 37 °C / 42 °C, que respectivamente se asocian a las transiciones desde la temperatura basal a hipotermia, de hipotermia a basal y de basal a hipertermia. Para ello se utilizó un termómetro de registro continuo (marca *Fluke*®, modelo *52II*), con un tiempo de muestreo de 10 s. Se realizó un ajuste por mínimos cuadrados para obtener las constantes de tiempo de las distintas curvas en las transiciones citadas. También se comprobó la estabilidad de la temperatura en la zona modificada y la influencia en la zona normotérmica.

¹ Se optó por dicho valor para disponer de suficientes puntos con los que estudiar la modulación gradual de la temperatura sobre las variables analizadas sin que el tiempo empleado en la ejecución del protocolo experimental comprometiera la integridad metabólica de la preparación.

3.4.3 Profundidad de actuación epicárdica

Con objeto de determinar el alcance de las variaciones térmicas a lo largo de la pared ventricular, se diseñó y construyó una aguja instrumentada de acero inoxidable –aislada con barniz– que albergaba tres termopares miniatura tipo K (marca RS, código 621-2158) para el registro de la temperatura a profundidad de 1 mm, 2 mm y 3 mm desde el epicardio, como se puede apreciar en la *Figura 3.7*. Tras el registro continuo de temperaturas descrito anteriormente, se retiró momentáneamente el dispositivo que modificaba la temperatura, se insertó la aguja en el epicardio haciendo coincidir el punto de inserción con el centro de la zona cubierta por el dispositivo y éste último fue colocado de nuevo en su ubicación original. Los hilos de los termopares de la aguja salían lateralmente con objeto de obtener un buen contacto electrodo-tejido, incluso con la aguja insertada. Las temperaturas intramurales se registraron transcurridos al menos dos minutos tras la estabilización del dispositivo.

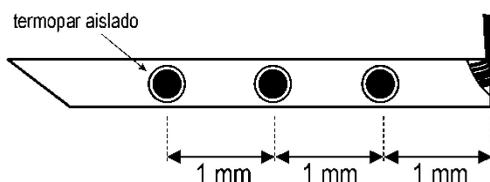


Figura 3.7 Representación esquemática de la aguja instrumentada para la medida de temperaturas endocárdicas

Adicionalmente, una vez obtenidos los resultados y con objeto de verificar la validez del método de medida del alcance intramural de las variaciones térmicas—concretamente en lo referente a un hipotético efecto interferente de la aguja que pudiera traducirse en una subestimación de las

temperaturas—se procedió de la siguiente manera en dos experimentos adicionales. Se utilizó un termopar guiado mediante un delgado hilo de seda atado al mismo. Con la ayuda de una aguja de sutura, el hilo se introdujo desde el endocardio, haciendo que el sensor discurriera perpendicularmente a través de la pared ventricular. La profundidad del punto de medición fue verificada a través de tres líneas previamente marcadas en el hilo. La visualización de cada una de estas líneas alineadas con el epicardio marcó la posición de la unión termoelectrónica en cada caso. Se reprodujo el mismo protocolo de temperatura que en los experimentos de la serie. Los resultados de las medidas mediante el termopar guiado fueron coincidentes con los de la aguja instrumentada, corroborando así que la presencia de la aguja no alteraba las mediciones.

3.4.4 Distribución de temperatura epicárdica

Ésta característica se comprobó en uno de los tres experimentos. En dicho experimento, tras los registros continuos de temperatura, al alcanzarse la temperatura final de los distintos escalones –basal (37 °C), hipotermia (37 °C) e hipertermia (37 °C)— y siempre antes de la inserción de la aguja, se obtuvieron imágenes termográficas epicárdicas utilizando una cámara de infrarrojos (modelo *ThermalCAM* ® *P60*, de la firma *Flir Systems Inc.*, Boston, EE.UU.). Con el fin de evitar cambios de temperatura en la zona modificada, mientras se registraba la imagen termográfica, se detuvo unos instantes la perfusión y se retiró rápidamente el dispositivo con el fin de fotografiar el área afectada. Con las imágenes obtenidas se verificó la distribución térmica superficial en la zona abarcada por el dispositivo

diseñado. En la fotografía mostrada en la *Figura 3.8* aparece la cámara de infrarrojos con la imagen termográfica de la preparación experimental.



Figura 3.8 Registro de la temperatura epicárdica de la preparación experimental mediante una cámara de infrarrojos

Capítulo 4. **Material y métodos**

En el Capítulo 1 se expusieron las diferentes posibilidades presentes en la investigación en electrofisiología cardiaca señalando aquellas que mejor se ajustaban para llevar a término la presente investigación y que tuvieron concreción en una propuesta metodológica realizada en el Capítulo 2. Del mismo modo, se concretó el objeto de la investigación y los parámetros a estudiar. En el presente capítulo, partiendo del desarrollo del dispositivo descrito en el Capítulo 3, se pretende detallar los materiales, instrumentos, técnicas y procedimientos empleados para la obtención de los resultados de la presente investigación, y se estructura en seis apartados. En el primero se presenta el entorno experimental en el que ha tenido lugar la investigación, ocupándose del sistema Langerdorff, las preparaciones experimentales empleadas, la legislación de aplicación, la instrumentación y el software. El siguiente apartado se dedica a los parámetros electrofisiológicos obtenidos. El tercer apartado se ocupa de los cálculos estadísticos realizados para la obtención de los resultados. Se continúa con el protocolo experimental empleado para la obtención de dichos parámetros. Para concluir se enumeran y se resaltan aquellos aspectos más destacados de otros protocolos experimentales realizados en el presente trabajo.

Índice del capítulo

4.1 Entorno experimental	115
4.1.1 Preparación experimental	116
4.1.2 Elementos de registro y estimulación. Ubicación	117
4.1.3 Instrumentación	121
4.1.4 Software	124
4.2 Parámetros electrofisiológicos analizados	125
4.2.1 Intervalo QT	126
4.2.2 Respuestas repetitivas e inducción de FV	127
4.2.3 Parámetros en fibrilación ventricular. Clasificación de mapas de activación.....	131
4.3 Cálculos estadísticos	137
4.4 Protocolo experimental	137
4.4.1 Primera parte: ritmo sinusal y estimulación programada....	138
4.4.2 Segunda parte: fibrilación ventricular	140
4.5 Otros experimentos complementarios	140
4.5.1 Desarrollo y aplicación de dispositivos enfriadores.....	141
4.5.2 Enfriamiento por inmersión progresiva de la preparación ..	143

Las tareas programadas en el apartado 2.5 que se describen en el presente capítulo se llevaron a cabo en los términos allí establecidos. Entre dichas tareas, las de carácter experimental se realizaron en el Laboratorio de Fisiología de la UV, consistieron en i) la realización de una serie de experimentos siguiendo un protocolo orientado a someter a la preparación a variaciones graduales y localizadas de temperatura en condiciones de ritmo sinusal, bajo estimulación programada y en FV, se describen en el apartado 4.4, y ii) la ejecución de otros protocolos orientados a conseguir la reversión de la FV en la preparación experimental mediante aplicación progresiva y selectiva de frío, se describen en el apartado 4.5. Por otro lado, en el Laboratorio del grupo BIO de la UPV se realizaron las tareas correspondientes al análisis de los registros obtenidos –referidos anteriormente en i)–, con las que se obtuvieron los parámetros electrofisiológicos que se describen en el apartado 4.2.

4.1 Entorno experimental

En materia legal, los trabajos se realizaron atendiendo la normativa referida en el subapartado 1.5.2. Las preparaciones experimentales de corazón aislado se obtuvieron de conejos de la raza New Zealand criados de forma controlada para investigación.

4.1.1 Preparación experimental

Configuración del sistema de perfusión

El sistema de perfusión es el elemento central sobre el que se sustenta el trabajo experimental, su funcionamiento y constitución fue descrito en el subapartado 1.5.3.

La bomba peristáltica empleada fue de la firma *Cole-Parmer Instrument Co.*[®], y la bomba circulante de termostatación, de *Neslab Instruments, Inc.*[®]. La presión y temperatura de la perfusión retrógrada de la solución de Tyrode –líquido nutricio– fue de 60 mmHg y 37 ± 0.5 °C; la composición milimolar de la solución fue: NaCl: 130; NaHCO₂: 24,2; KCl: 4,7; CaCl₂: 2,2; NaH₂PO₄: 1,2; MgCl₂: 0,6 y Glucosa: 12; la oxigenación de la misma se efectuó con una mezcla de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂.

Extracción y adecuación de la preparación

Los animales se pesaron con una balanza de la firma *Soehnle*[®], y las preparaciones –una vez concluido la ejecución del protocolo experimental– con una balanza de precisión *Precisa Balances*[®], modelo *GF-2000*.

Tras la sedación con ketamina (25 mg/kg intravenosa), heparinización y sacrificio de los animales mediante dislocación cervical, se extrajo rápidamente el corazón sumergiéndolo en una solución de Tyrode frío (4 °C). Después de adecuar la aorta, se conectó al sistema de Langendorff. Las imágenes de la *Figura 4.1* ilustran la secuencia del proceso.

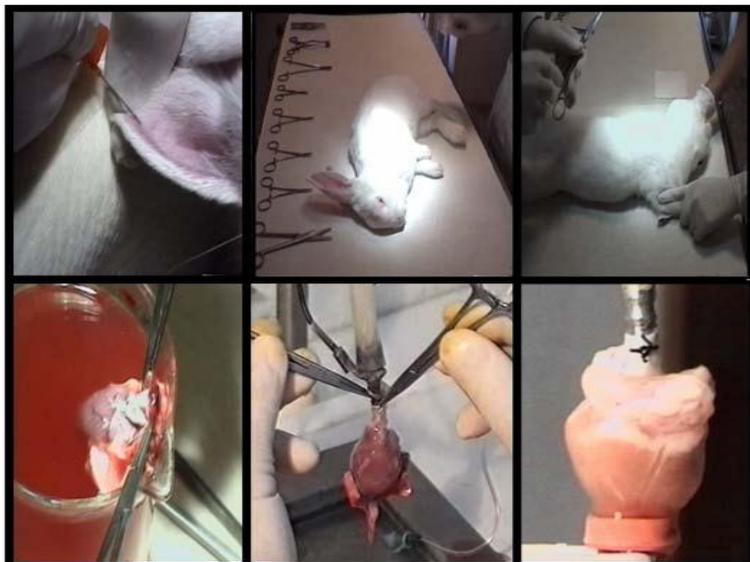


Figura 4.1. Imágenes tomadas durante la extracción y ubicación de la preparación en el sistema Langendorff. De izquierda a derecha, y de arriba abajo: anestesia a través de la vena marginal izquierda, animal anestesiado, previo a la extracción una vez sacrificado, corazón sumergido en baño de Tyrode frío, inserción de la aorta en la cánula del sistema, y preparación ya fijada al sistema. [obtenido de Pelechano 2008]

4.1.2 Elementos de registro y estimulación. Ubicación

Una vez conectado el corazón al sistema de perfusión, para la ejecución posterior del protocolo experimental principal descrito en el apartado 4.4, se dispusieron en contacto con la preparación los siguientes elementos de registro y estimulación: electrodo múltiple modificador de la temperatura, electrodo múltiple convencional, electrodo indiferente, electrodo bipolar de estimulación, electrodo unipolar de monitorización y termopares. Posteriormente estos elementos se conectaron a la instrumentación referida en subapartado 4.1.3. La fotografía de la *Figura 4.2* muestra una vista real de

la preparación —tomada desde la pared posterior del ventrículo izquierdo— con los electrodos situados en su posición definitiva. Y la *Figura 4.3* muestra una representación esquemática de la distribución de los elementos.

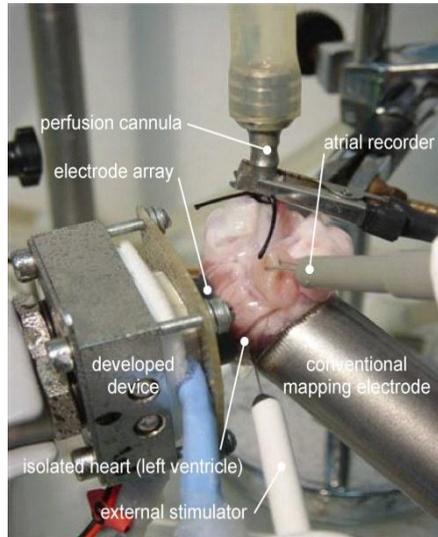


Figura 4.2. Detalle de la distribución de elementos durante la realización del protocolo experimental.

El dispositivo descrito en el apartado 3.2 —electrodo múltiple modificador de la temperatura— se posicionó en la pared anterior del ventrículo izquierdo (*Figura 4.2*) con objeto de registrar los electrogramas unipolares correspondientes a la zona donde se provocarían más tarde las modificaciones térmicas controladas, a partir de ahora “zona modificada” (ZM).

Otro electrodo múltiple, de 103 canales útiles, en este caso convencional, se situó en la pared posterior del ventrículo izquierdo. Sus registros corresponden a la zona normotérmica (ZN), o no modificada

térmicamente. Consistió en una placa cuadrada de 1.5 cm de lado con 121 electrodos unipolares de acero inoxidable (diámetro 0.125 mm, distancia entre electrodos 1mm) fabricado mediante la disposición en forma de matriz cuadrangular de hilos de acero inoxidable con aislamiento de silicona, en molde de resina epoxy. La discrepancia entre el número de electrodos unipolares y el de canales útiles resultantes se debe a condicionantes de conexión con el sistema de registro *MapTech* descrito en el subapartado 4.1.2.

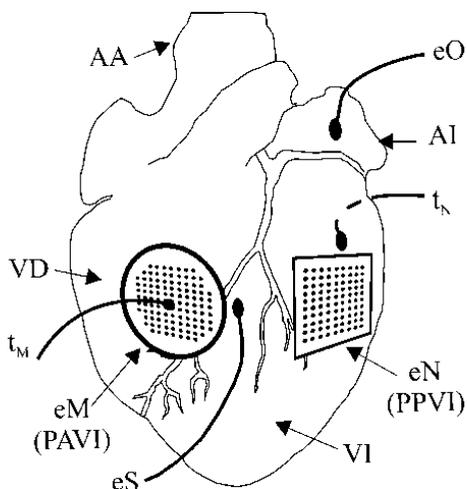


Figura 4.3. Representación esquemática de la distribución de elementos durante la realización del protocolo experimental. Abreviaturas: AA, arteria aorta; AI, aurícula izquierda; VD, ventrículo derecho; VD, ventrículo izquierdo; PAVI, pared anterior ventrículo izquierdo; PPVI, pared posterior ventrículo izquierdo; eM, electrodo modificador; eN, electrodo convencional; eS, electrodo de estimulación; eO electrodo indiferente; tM, termopar zona modificada; tN, termopar zona no modificada.

El electrodo indiferente estaba situado por encima de la aorta canulada, se utilizó una placa de Ag/AgCl de 4x6 mm.

En la zona del ventrículo izquierdo que quedaba libre entre los electrodos múltiples se dispuso el electrodo de estimulación, bipolar, de acero inoxidable (diámetro 0.125 mm, y separación entre electrodos 1 mm).

Se dispuso un electrodo unipolar en la aurícula izquierda para monitorizar la actividad auricular durante la realización del experimento.

Mediante termopares¹, se registró la temperatura de ambas zonas del epicardio ventricular (ZM y ZN). La primera mediante el termopar integrado en el dispositivo descrito en el subapartado 3.3.1, la segunda mediante un termopar situado en una zona del epicardio ventricular alejada de la zona modificada, próxima al electrodo convencional y en la parte opuesta a la que mira el electrodo modificador, esto es, en el ventrículo derecho.



Figura 4.4 Sistema de adquisición Map Tech©. Módulo hardware para la ampli-ficación y digitalización (vista frontal donde se observan los conectores de los electrodos -izq.) y software PaceMap© de representación y análisis (dcha.)

¹ Termopares tipo K, diámetro 0.2 mm y aislamiento de PTFE, según norma BS4937

4.1.3 Instrumentación

Tras la ubicación de los elementos de registro y estimulación descritos en el apartado anterior, todos ellos se conectaron a los instrumentos que se describen a continuación.

Las señales captadas por los electrodos de registro correspondientes a los electrogramas unipolares epicárdicos —registradas con el dispositivo electrodo multipolar descrito en el Capítulo 3, el electrodo multipolar convencional y el electrodo unipolar— fueron adquiridas y digitalizadas mediante un sistema de cartografía de la actividad eléctrica cardíaca *MapTech* (Waalre, Holanda), de 256 canales, ganancia 50-300, ancho de banda 1-400 Hz, frecuencia de muestreo por canal 1 kHz y resolución 12 bits. En la *Figura 4.4* se muestra el sistema, constituido por una etapa de acondicionamiento de señales y digitalización, un PC con una tarjeta de adquisición de datos y el software *PaceMap* que permite la monitorización de señales durante el experimento y su análisis posterior. Los registros obtenidos en los experimentos fueron almacenados en soporte digital para su análisis posterior.

Los termopares de cada zona del epicardio (ZM y ZN) se conectaron a sendos termómetros digitales de dos canales de la firma *Fluke*®, modelos *52II* y *51II*.

La estimulación ventricular se efectuó utilizando un estimulador *Grass*®, modelo *S88* —al que se conectó el electrodo bipolar de estimulación—, que permite emitir pulsos de corriente, y que está provisto de una unidad de aislamiento de estímulos (modelo *SIU5*, de la misma firma). Los estímulos aplicados corresponden a impulsos rectangulares con

una duración de 2 ms y una amplitud doble del umbral diastólico. En la *Figura 4.5* se muestra el estimulador utilizado.



Figura 4.5 Estimulador GRASS S88 (vista frontal)

En la *Figura 4.6* se representa de forma esquemática la instrumentación mencionada, los elementos de registro y estimulación, y el modelo de corazón perfundido que conforma el sistema experimental empleado. En ella, se muestra cada una de las partes y equipos utilizados durante la realización del protocolo experimental. A continuación se relacionan, a modo de resumen explicativo, el funcionamiento de estas partes y su papel e interrelación con el resto de elementos durante la realización del protocolo experimental descrito en el apartado 4.4.

1. El sistema Langendorff asegura el aporte metabólico adecuado a la preparación mediante la perfusión retrógrada de Tyrode a temperatura y presión constantes que mantienen la circulación coronaria. Para ello, la mezcla nutricia, previamente preparada, es oxigenada e impulsada por la bomba peristáltica hasta entrar en la cámara de perfusión, previo paso por el depósito de calentamiento.

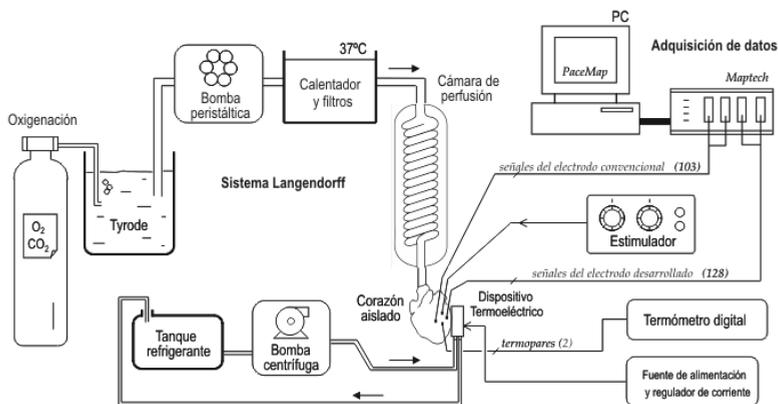


Figura 4.6 Representación esquemática del sistema experimental: preparación, sistema Langerdorff, elementos de registro y estimulación, e instrumentación.

2. Los dos electrodos múltiples —el convencional y el diseñado específicamente para esta investigación, que forma parte del dispositivo modificador de la temperatura— se sitúan en sus localizaciones correspondientes de la pared libre del ventrículo izquierdo (ZN y ZM, en pared posterior y anterior respectivamente). Los terminales de estos electrodos se conectan al sistema de adquisición de datos MapTech, para el registro de los electrogramas.
3. Un electrodo bipolar de estimulación, utilizado durante la inducción de la fibrilación y en el test del extraestímulo, se sitúa en la zona del ventrículo izquierdo que queda libre entre los electrodos múltiples.
4. El termopar que registra la temperatura no modificada (TN) y el termopar integrado en el electrodo diseñado (TM), se conectan a sendos termómetros digitales para la monitorización y registro de las temperaturas.

5. El líquido refrigerador² del depósito exterior se hace circular continuamente, por acción de la bomba centrífuga, a través del interior del bloque refrigerador del dispositivo-electrodo —se trata de un circuito cerrado. El objeto de esta operación es evacuar el flujo de calor extraído hacia la cara externa de la célula Peltier durante el enfriamiento local de la preparación. De esta manera se mantiene constante la temperatura de esta cara y se facilita el ajuste de la temperatura de la zona modificada. El control se realiza de manera manual, actuando sobre los mandos de regulación gruesa y fina de la fuente de corriente constante, hasta que la temperatura de esta zona alcanza el valor deseado. Durante la realización del experimento se monitoriza la temperatura del líquido refrigerador de modo que se mantenga en los márgenes de -15 a 5 °C.

4.1.4 Software

En la fase de adquisición de las señales eléctricas durante los experimentos, y en el posterior procesado y análisis de los datos obtenidos, se utilizaron fundamentalmente dos entornos de trabajo (*Figura 4.4*). Por una parte el software *PaceMap*®, incorporado en el sistema de adquisición *MapTech*. Y por otro lado, en *Matlab*® se desarrollaron *scripts*³ para extraer información de los registros.

² Disolución de agua y etilenglicol, temperatura de congelación inferior a -25°C, antes de su uso en la realización del protocolo experimental se almacenaba en un arcón congelador cuya temperatura se mantenía entre -15 y -20°C.

³ En informática un guion, archivo de órdenes o archivo de procesamiento por lotes, vulgarmente referidos con el barbarismo *script*, es un programa usualmente simple, que por lo regular se almacena en un archivo de texto plano.

PaceMap© (año 2002) es el software del sistema de mapeo cardiaco *MapTech* utilizado en la captura y análisis de electrogramas en los experimentos, y funciona bajo sistema operativo *Windows*. Realiza las funciones de configuración de la adquisición, permitiendo el cambio de la ganancia, frecuencia de muestreo, control del registro, monitorización de electrogramas en tiempo real simultáneo con el registro, edición del registro y extracción de los episodios significativos, etc. Una vez almacenados en el ordenador los registros temporales seleccionados, este software permite su visualización por grupos de canales y la realización de diversas operaciones relacionadas con la cartografía de la actividad eléctrica cardiaca o el marcado de instantes en los electrogramas. Previamente es necesario definir y proporcionar al programa las matrices de correspondencia electrodo-canal que codificarán la distribución espacial de las señales. A partir de los mapas de activación epicárdica se determinó la velocidad de conducción.

Entre los *scripts* de *MatLab* empleados en la presente investigación destaca el algoritmo empleado para automatizar la identificación de los tiempos de activación en FV, y la consiguiente determinación de los intervalos VV –intervalos de tiempo entre dos activaciones o despolarizaciones locales consecutivas, intervalo fibrilatorio– en los electrogramas registrados [Ibáñez-Català et al. 2009], referido en el subapartado 1.1.4 y ampliado en 4.2.3.

4.2 Parámetros electrofisiológicos analizados

En el apartado 1.8 se presentó el interés de su planteamiento, y en el apartado 2.3 se formuló su determinación. Se han obtenido diferentes parámetros electrofisiológicos a partir de las señales registradas en las dos zonas sometidas a estudio: la modificada térmicamente (ZM) y la

normotérmica (ZN) o no modificada; bajo distintas condiciones de actividad funcional de las preparaciones experimentales: a ritmo sinusal (RS), en estimulación programada (EP) y en fibrilación ventricular (FV). La forma en que se han determinado dichos parámetros se describe en los tres siguientes subapartados.

4.2.1 Intervalo QT

En condiciones de ritmo sinusal se ha analizado este parámetro.

- **Intervalo QT (QT)**. Definido como el intervalo entre el inicio de la activación y el final de la onda T, considerando éste último como el instante en el que cambia la pendiente de forma de onda o bien se cruza con la línea isoeletrica [Copie et al. 1997, Goldenberg 2006], como queda ilustrado en la *Figura 4.7*. Estas medidas se realizaron de forma manual para cinco canales situados en la parte central de cada electrodo, obteniendo el promedio para cada temperatura en cada zona.

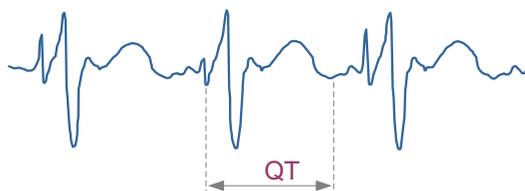


Figura 4.7 Determinación del intervalo QT sobre un electrograma

4.2.2 Respuestas repetitivas e inducción de FV

Test del extraestímulo

Se utilizó este test (TEE) para someter a la preparación a una estimulación intensiva que facilitase la aparición de respuestas repetitivas. El test consiste en la aplicación de un tren base de n impulsos de excitación bipolares (St) con separación temporal fija (ciclo básico, CB), seguido de un estímulo adicional tras un retardo variable, denominado extraestímulo (St_1). Como se aprecia en el electrograma de la *Figura 4.8*, cada impulso de estimulación se ve reflejado con el correspondiente artefacto o espícula sobre el electrograma, y a éste le sucede la consiguiente despolarización, de modo que cada estímulo provoca su correspondiente “captura” o despolarización del ventrículo.

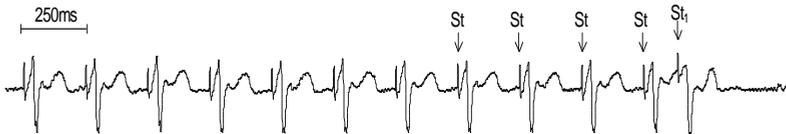
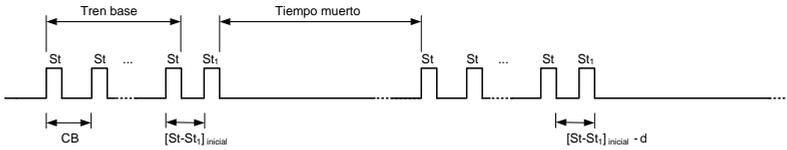


Figura 4.8 Electrograma ventricular registrado en un experimento durante el test del extraestímulo. Abreviaturas: St, estímulos consecutivos del tren base; St_1 , extraestímulo.

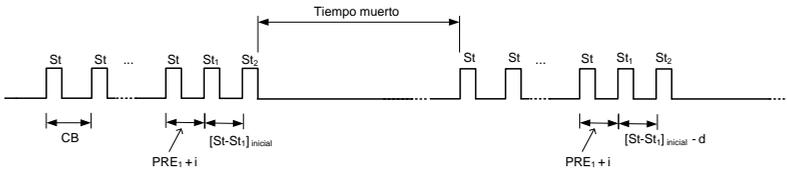
La operación se repite cíclicamente después de un tiempo muerto. Tras cada repetición, el extraestímulo se acerca gradualmente al último impulso del tren base, es decir el retardo entre ambos –el intervalo $St-St_1$ en la *Figura 4.8*– se decreta paulatinamente en pasos múltiples de un valor d . En la *Figura 4.9*, en la parte superior se representan señales correspondientes a la descripción anterior (TEE con un extraestímulo). Dadas las características de refractariedad del tejido cardíaco, llega un

momento en el que el extraestímulo no va acompañado de la consiguiente captura.

TEE con un extraestímulo



TEE con dos extraestímulos



TEE con tres extraestímulos

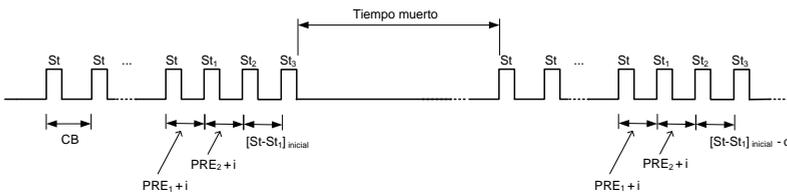


Figura 4.9 Test del extra-estímulo (TEE), con uno dos y tres extra-estímulos. Detalle de los intervalos entre estímulos.

Otras variantes del TEE consisten en la aplicación sucesiva del test con extraestímulos adicionales. Si en primer lugar ha sido como se ha expuesto con un único extraestímulo (TEE_1 con St_1), posteriormente se realiza con dos (TEE_2 con St_1 y St_2) y después con tres extraestímulos (TEE_3 con St_1 , St_2 y St_3). En la *Figura 4.9* se puede apreciar la conformación de las señales de estimulación en los tres casos.

Análogamente como sucede en el TEE₁, tanto en el TEE₂ como en el TEE₃, el intervalo entre el último extraestímulo aplicado y el impulso inmediato anterior es variable y se va decrementando de forma gradual a partir de un determinado valor inicial hasta observar el retardo en el cual deja de producirse captura. En ese momento dicho intervalo corresponderá a PRE₂ si se trata del TEE₂, o a PRE₃ si lo es de TEE₃. Se tomará el mismo valor inicial de partida en los tres casos (TEE₁, TEE₂ y TEE₃).

En el TEE₂ el intervalo St-St₁ se mantendrá constante durante la realización del test y tendrá un valor igual al PRE₁ más un incremento (i) tal que garantice la consiguiente captura. Análogamente, en el TEE₃ el intervalo St-St₁ tomará el mismo valor, es decir PRE₁+i, y el intervalo St₁-St₂ será PRE₂+i, ambos se mantendrán constantes.

En el presente trabajo, en cada escalón de temperatura se repitió el TEE, con trenes base de 10 impulsos, con dos ciclos base diferentes, uno largo y uno corto, de 250 y 150 ms respectivamente, y en cada uno de ellos a su vez, con uno, dos y tres extra-estímulos. Los decrementos (d) eran de 5 ms y los incrementos de 15 ms. Para reducir el número de trenes aplicados en el TEE₁, inicialmente se establecía el intervalo St-St₁ igual al ciclo base (CB), se aplicaban trenes reduciendo dicho intervalo de forma gruesa hasta que se observaba la pérdida de captura, dicho tiempo incrementado en 45 ms se establecía como St-St₁ inicial.

Presencia de respuestas repetitivas

- **Respuestas Repetitivas (RR).** En los registros obtenidos se han determinado la presencia de respuestas repetitivas, su número y las condiciones bajo las que han aparecido. Se entiende por respuesta repetitiva a la aparición tras los extraestímulos de una o varias

despolarizaciones espontáneas no producidas directamente por la estimulación externa o provenientes del nodo sinusal.

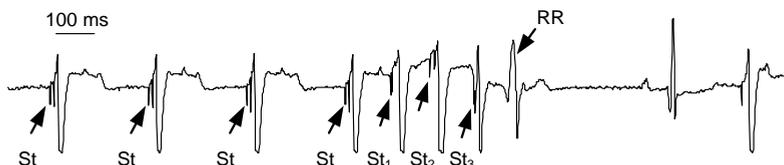


Figura 4.10 Electrograma con presencia de respuesta repetitiva

El electrograma representado en la *Figura 4.10*, corresponde a la respuesta a los cuatro impulsos finales de un tren seguidos de tres extraestímulos, durante la aplicación del TEE. Sobre el electrograma se aprecia el artefacto asociado a los impulsos de estimulación y la consiguiente despolarización. A diferencia de los estímulos precedentes, al tercer extraestímulo le sigue una despolarización espontánea, es decir que no ha sido producida por un estímulo ni ha sido transmitida desde el nodo sinusal. Esta última despolarización corresponde a una respuesta repetitiva.

Con la información obtenida para cada experimento: número de respuestas repetitivas en las situaciones de hipotermia, hipertermia y a la temperatura de la perfusión, se ha realizado la prueba Chi cuadrado para tablas de contingencia, analizando la dependencia entre la presencia de dichas respuestas y las modificaciones térmicas inducidas.

Inducción de FV

Durante la realización de los protocolos experimentales también se ha analizado si el protocolo de estimulación inducía la aparición de FV.

4.2.3 Parámetros en fibrilación ventricular. Clasificación de mapas de activación

La inducción de la FV se realizó mediante sobreestimulación ventricular. Para la obtención de los parámetros descritos en este subapartado, ha sido necesario determinar previamente los instantes de activación. Ello se ha realizado de forma automática mediante una aplicación desarrollada con *MatLab*® [Ibáñez-Català et al. 2009]. El algoritmo empleado identifica las activaciones miocárdicas locales con deflexiones negativas bruscas en el electrograma que conservan continuidad espacio temporal con las vecinas. Para incrementar la robustez de la detección ante oscilaciones de la línea base, se establece que dichas deflexiones deben cruzar un umbral, que se fija como el 10% de la amplitud máxima del electrograma. Se descartan aquellas deflexiones que, en el mismo electrograma, presenten una deflexión demasiado próxima en el tiempo –inferior a 25 ms– o aquellas que, por su naturaleza aislada, no presenten ninguna activación en los electrodos adyacentes antes o después de un tiempo de conducción máximo –se establece en 5ms. En la Figura 4.11 se muestran se muestran las marcas en los instantes en los que se produce la despolarización.

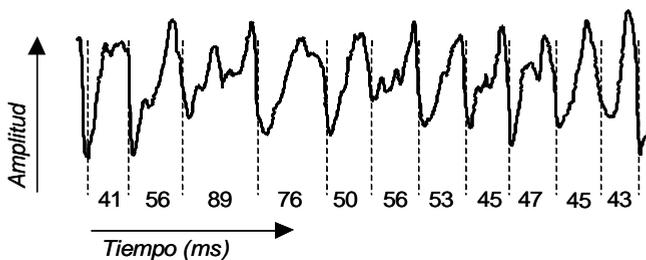


Figura 4.11 Segmento de electrograma de FV donde se muestra el marcado de los instantes de activación e intervalos VV (en milisegundos).

Los parámetros obtenidos en condiciones de FV han sido los siguientes:

- **Intervalo VV de la FV:** Se define como el tiempo transcurrido entre dos activaciones locales consecutivas en el ventrículo. También se hace referencia a dicho parámetro con el nombre de intervalo de activación ventricular. En la *Figura 4.11* se muestran los intervalos VV.

De los registros obtenidos a las diferentes temperaturas, se han analizado los segmentos correspondientes a los primeros 8 s. Considerando el promedio de los intervalos VV consecutivos, se ha obtenido el VV-medio para cada canal. Dicha información ha permitido realizar sendos mapas de VV, uno en la zona modificada y otro en la no modificada, para cada temperatura.

Además, se ha obtenido el valor promedio VV de cada zona para cada temperatura. Se han agrupado, por un lado el conjunto de intervalos VV consecutivos de los canales de la zona modificada, y por otro los de la zona no modificada, obteniéndose los correspondientes histogramas de distribución VV para las diferentes temperaturas.

- **Percentil 5 de los intervalos VV (Pct5).** Se ha obtenido a partir de los citados histogramas. Dicho parámetro es representativo de la refractariedad del tejido en condiciones de FV (ver subapartado 1.8.4).
- **Velocidad de conducción (VC).** Se ha calculado en aquellos mapas en los que los frentes de activación atravesaban el área abarcada por el electrodo sin evidencias de fraccionamiento, haciendo un promedio de cinco determinaciones. Sobre los mapas, se han identificado dos electrodos situados en una línea de dirección

perpendicular a las isócronas, la velocidad de conducción resulta del cociente entre la distancia que separa los electrodos, expresada en cm, y la diferencia entre los instantes de activación asociados a los mismos, en segundos. Para reducir la magnitud del posible error, la distancia entre electrodos ha sido mayor que 5 mm. Por otro lado, como los frentes de onda se pueden propagar de manera no paralela a la superficie epicárdica, la velocidad de conducción real pudiera ser más lenta que el valor medido. Para evitar dicha situación, y el consiguiente error, se han utilizado únicamente aquellos mapas en los que la entrada y salida del frente de onda se identificaron en los bordes de los mapas de activación. Se ha determinado la velocidad de conducción en la zona modificada y en la no modificada, a la temperatura de perfusión, en hipotermia e hipertermia.

- **Longitud de onda durante la FV (LO).** Se ha determinado calculando el producto de Pct5 y VC, con las reservas expuestas anteriormente sobre el parámetro Pct5 y la refractariedad.

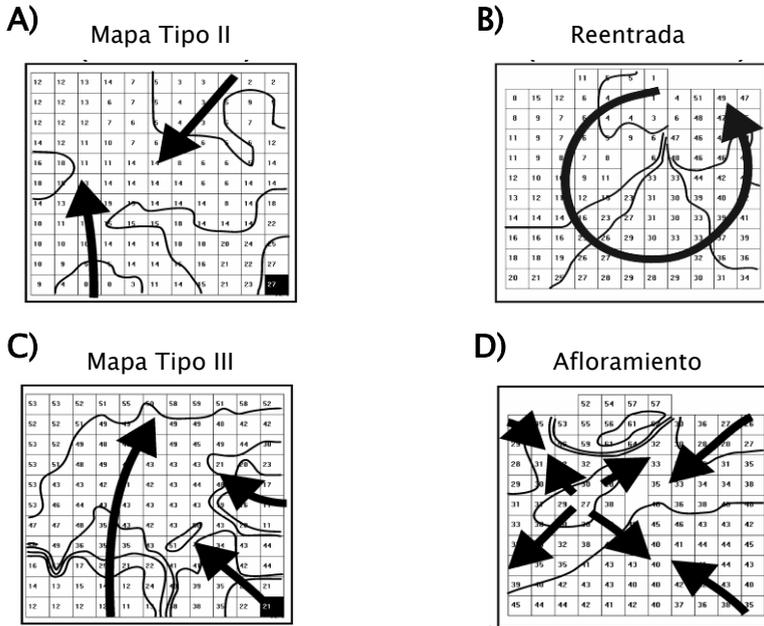


Figura 4.12 Ejemplos de mapas de activación ventricular tipo II, III, reentrada y afloramiento, obtenidos durante la FV. Se muestran los tiempos de activación ventricular y las isócronas trazadas a intervalos de 10 ms. Las flechas corresponden a la evolución de los frentes de onda. A) Mapa de activación ventricular tipo II. Se observa la entrada de un frente de onda por la parte inferior y otro por la parte superior derecha. C) Mapa de activación ventricular tipo III. En la zona inferior derecha se observa la entrada de dos frentes de activación simultáneos, que son bloqueados por la entrada del frente desde la zona inferior izquierda que se desplaza hacia la parte superior del mapa. B) Mapa de activación ventricular en el que se aprecia un patrón de activación de reentrada completa alrededor de la zona central representada por la mayor densidad de isócronas. Se observa que la zona de excitación circula describiendo un giro antihorario. D) Mapa de activación ventricular en el que se aprecia un patrón de activación de afloramiento. Se observa que la activación sale desde el centro, de manera centrífuga.

- **Clasificación de los mapas de activación.** Cada uno de los mapas analizados han sido clasificados en tres categorías basadas en la complejidad de los mismos y siguiendo un esquema similar al descrito por Konings [Konings et al. 1994], en el análisis de los mapas de activación durante la fibrilación auricular (Figura 4.12): el

Tipo I corresponde a mapas de activación con un frente de ondas simple propagándose uniformemente sin retraso significativo de la conducción, el Tipo II es propio de mapas de activación con dos frentes de ondas, o un frente de ondas con áreas de retraso o bloqueo de la conducción, y el Tipo III se asocia a mapas de activación con tres o más frentes de ondas asociados con áreas de conducción lenta y de bloqueo de la conducción. Asimismo en cada mapa se analizó si se detectaban patrones de activación correspondientes a afloramientos y a reentrada completa.

Se ha realizado el análisis de los mapas de activación epicárdica durante la FV. Se han analizado segmentos de dos segundos extraídos de los registros de FV obtenidos a la temperatura de perfusión, en condiciones de hipotermia e hipertermia, en ambas zonas –modificada y no modificada–, teniendo presente que la FV en el modelo utilizado, en el que se impide el deterioro metabólico al mantener la perfusión coronaria, es estable durante el tiempo en el que se ha mantenido la arritmia [Chorro et al. 1996]. El segmento analizado se ha dividido en ventanas de tiempo consecutivas con una duración de 100 ms, y en cada ventana se han identificado los patrones de activación construyendo las isocronas, que se han trazado de forma semiautomática, utilizando la codificación en colores de los tiempos de activación correspondientes a cada electrodo que ofrece el software *Pacemap*. En los mapas de activación se ha estudiado la existencia de líneas de bloqueo de conducción, colisiones, reentradas completas y patrones de afloramiento.

Se han definido como zonas de bloqueo a aquellas en las que la velocidad de conducción estimada ha sido inferior a 5 cm/s, delimitando

áreas con distinta dirección del proceso de activación. Para identificar la activación reentrante se ha utilizado como guía la visualización en la pantalla de los tiempos de activación correspondientes a cada electrodo codificados en color, desplazando sucesivamente el intervalo de tiempo analizado en escalones de 10 ms.

Cuando mediante este procedimiento se identifica un frente de ondas, que tras describir una trayectoria circular o elíptica vuelve a activar la zona previamente activada por él mismo, entonces se delimita la zona central de la reentrada utilizando como referencia la parte interna del frente de onda, esto es, la zona central de la reentrada corresponde al espacio comprendido entre los electrodos más cercanos activados en direcciones opuestas durante la trayectoria circular del frente de ondas. Se ha considerado como activación reentrante aquélla en la que se produce al menos un giro completo, es decir, aquellos casos en los que el proceso de activación vuelve a activar la zona previamente activada por el mismo frente (reentrada completa).

Cada uno de los 20 mapas correspondientes a cada ventana analizada, ha sido clasificado en tres categorías basadas en la complejidad de los mismos, como se ha comentado anteriormente. Asimismo, en cada mapa se analizó si se detectaban patrones de activación correspondientes a frentes de onda simples, reentradas completas, afloramientos y colisiones entre frentes. Se realizó el recuento de cada uno de dichos patrones para cada mapa analizado. En cada experimento y tanto en la zona modificada como en la no modificada, se ha realizado el recuento de patrones de activación y la clasificación a la temperatura de perfusión, en hipotermia y en hipertermia.

4.3 Cálculos estadísticos

Los datos se han presentado con la media aritmética acompañada (\pm) de la desviación estándar correspondiente, con indicación del número de casos analizados (n). La normalidad de los datos se ha verificado mediante el test de Kolmogorov-Smirnov antes de aplicar pruebas paramétricas. Las comparaciones entre dos grupos de datos se han realizado mediante el Test de Student para datos apareados, mientras que las comparaciones para un conjunto de datos se han realizado mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA para medidas repetidas). La determinación de la dependencia entre variables se ha realizado mediante el Test Chi cuadrado para tablas de contingencia. Las regresiones lineales entre pares de variables se han efectuado utilizando el método de mínimos cuadrados. Se han considerado significativas las diferencias para valores de p menores que 0.05.

En el análisis estadístico se han empleado el paquete de análisis estadístico *SPSS*® (versiones 10.0.6 y 11.5.1) de la firma *SPSS Inc.*, así como la hoja de cálculo del paquete *Microsoft*® *Oficce, Excel 2007*.

4.4 Protocolo experimental

Una vez ubicada la preparación en el Sistema Langerdorff según lo descrito en el subapartado 4.1.3, se dejaron transcurrir veinte minutos, tiempo durante el cual se situaron sobre la preparación los elementos de registro y estimulación referidos en 4.14, conectándolos a su vez a la instrumentación correspondiente que se describe en el subapartado 4.1.5, comprobando el correcto funcionamiento del conjunto.

Se planteó un protocolo experimental encaminado a la obtención de los parámetros expuestos en el apartado anterior, dividido en dos partes que se llevaron a cabo secuencialmente. En la primera se realizaron registros en ritmo sinusal y posteriormente con estimulación programada –aplicando el test del extraestímulo–, se provocaron alteraciones térmicas locales escalonadas a diferentes temperaturas. El propósito principal consiste en la determinación de la inducibilidad de la FV mediante alteraciones térmicas así como la medida de parámetros electrofisiológicos. En la segunda parte se indujo la FV, y del mismo modo se provocaron alteraciones térmicas –locales y a las mismas temperaturas– realizando los correspondientes registros en cada una de ellas.

En cada uno de los registros realizados se midió la temperatura en la zona modificada (TM) y en la no modificada o normotérmica (TN). De modo que todos los parámetros electrofisiológicos analizados y extraídos de dichos registros tienen asociada una medida de temperatura. Dicha medida será TM o TN, en función de que el canal que se considere en el análisis pertenezca al dispositivo desarrollado –zona modificada (ZM)– o al electrodo convencional –zona normotérmica (ZN).

4.4.1 Primera parte: ritmo sinusal y estimulación programada

Con el electrodo diseñado –ajustando convenientemente la corriente que circula por la célula Peltier– se provocaron situaciones de hipotermia e hipertermia locales en la zona modificada. De forma escalonada y siguiendo

la secuencia indicada a continuación⁴, se dejó estabilizar tres minutos la temperatura en los puntos: 37 °C –primer control, temperatura basal de perfusión–, 32 °C, 27 °C y 22 °C –hipotermia máxima–, 37 °C –segundo control–, 42 °C –hipertermia máxima–, y 37 °C –tercer control. Ello se ilustra en la *Figura 4.13*.

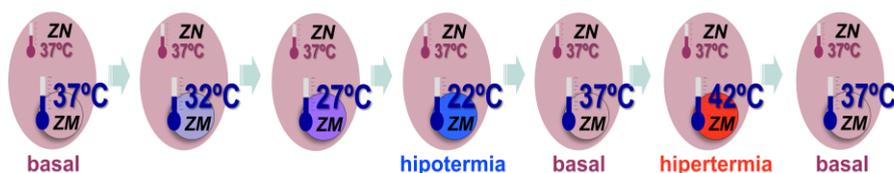


Figura 4.13 Representación esquemática de la secuencia de modificaciones térmicas localizadas efectuadas de forma escalonada sobre la preparación durante la ejecución del protocolo experimental (ZM, zona modificada; ZN zona normotérmica).

Para cada escalón, una vez alcanzada y estabilizada ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) la temperatura correspondiente se realizaron las siguientes operaciones: i) se registraron las temperaturas en la zona modificada y no modificada (TM, TN); ii) se realizó un registro de los electrogramas a ritmo sinusal; iii) se determinó y registró la amplitud del umbral de captura de la señal de estimulación; iv) se realizó el TEE, registrando los electrogramas desde el comienzo de la estimulación aplicada hasta el instante en que el extra-estímulo aplicado no produce captura, es decir alcanzado el PRE. El TEE se aplicó con una amplitud doble del umbral diastólico, con doce impulsos de tren base y disminuyendo el intervalo de acoplamiento en escalones de 5ms desde el ciclo base (CB) hasta alcanzar el PRE, todo ello a diferentes CB: 250 y 150 ms, y con 1, 2 y 3 extra-estímulos, en cada uno de ellos.

⁴ En el subapartado 3.4.1 se describe y justifica la determinación del margen de temperatura y los distintos escalones. La elección de la secuencia de temperaturas permitirá obtener conclusiones acerca de la reversibilidad.

A partir de los registros obtenidos tanto para la zona modificada como la no modificada, se determinaron tanto QT (durante RS), así como la presencia de respuestas repetitivas (RR) (durante EP), según lo visto en los subapartados 4.2.1 y 4.2.2.

4.4.2 Segunda parte: fibrilación ventricular

Concluida la primera parte del protocolo, se indujo la FV mediante estimulación a frecuencias crecientes y se dejaron transcurrir cinco minutos comprobando que el estado de FV era estable y no se producía una reversión espontánea. Se volvieron a provocar alteraciones térmicas locales con el electrodo diseñado siguiendo idéntica secuencia, en cuanto a escalones de temperatura, que en la primera parte del protocolo, es decir tal como se ilustra en la *Figura 4.13*. En cada escalón se realizó un registro continuo de 10 s de la señal fibrilatoria, previamente se registraron las temperaturas, TM y TN.

A partir de los registros obtenidos tanto para la zona modificada como la no modificada, se determinaron los intervalos VV, el Pct5 de los VV, la VC y la LO, así como el análisis los mapas de activación –en los que se hizo un recuento de los patrones observados y se clasificó su complejidad según lo visto en el subapartado 4.2.3.

4.5 Otros experimentos complementarios

Al margen del protocolo experimental principal descrito en el apartado anterior, y el correspondiente a la caracterización del dispositivo desarrollado descrito en el Capítulo 3, se realizaron otros protocolos experimentales con el propósito de provocar la reversión de la FV aplicando

modificaciones térmicas epicárdicas. El interés de su planteamiento se expuso en el subapartado 1.8.6. Se plantearon dos protocolos diferenciados, el primero utilizando diversos dispositivos enfriadores de concepción similar al descrito en el Capítulo 3, ello implicó el desarrollo de los mismos. El segundo protocolo consistió en la inmersión progresiva de la preparación. La ejecución de ambos protocolos fue posterior a las tareas descritas en 4.4.

4.5.1 Desarrollo y aplicación de dispositivos enfriadores

Los dispositivos enfriadores auxiliares se diseñaron y construyeron de forma similar al descrito en el apartado 3.2 con la salvedad de: i) integrar un único canal de registro, ii) reducir sus dimensiones de forma notable, y iii) evitar la utilización de resina epoxi. Ello tenía por objeto permitir la actuación térmica simultánea y directa de varios de estos dispositivos sobre la misma preparación experimental. El enfriamiento se conseguía mediante células Peltier cuya cara fría estaba en contacto directo con la superficie epicárdica. En el centro de la superficie de dicha cara de la célula se adhirieron un termopar y un electrodo de registro unipolar.

La célula empleada es el modelo *PE-031-10-13-S*, de la firma *Supercool*[®], dispone de un sellado perimetral que le confiere hermeticidad. Sus dimensiones son 15 x 15 x 3.6 mm, sus características eléctricas de corriente, tensión y potencia máximas son respectivamente: 3.9 A; 3.8 V y 9.3 W; y gradiente térmico máximo entre caras 74 °C. El bloque refrigerador empleado está fabricado en cobre y recubierto de níquel, modelo *Memories BGA*, de la firma *Alphacool*[®], sus dimensiones son 15 x 15 x 5 mm, tiene la entrada y salida de líquido refrigerante para tubo flexible. De la misma

forma como se describe en el subapartado 3.2.2, a través del refrigerador circula una solución de agua y etilenglicol.



Figura 4.14 Aplicación simultánea de tres dispositivos enfriadores sobre la preparación experimental. En la parte izquierda aparece un enfriador situado en la pared anterior del ventrículo izquierdo (VI), al frente otro situado en la pared lateral del VI, y detrás de la preparación el tercero en la pared posterior del VI y ventrículo derecho (VD). El electrodo de color rojo corresponde al de estimulación y se sitúa entre la pared lateral del VI y el VD.

Se realizaron dos experimentos preliminares con objeto de observar los efectos que tenía someter a otras regiones epicárdicas a heterogeneidades térmicas en condiciones de FV, buscando conseguir la reversión de la FV mediante el enfriamiento simultáneo local en tres regiones epicárdicas. Para ello se dispusieron simultáneamente los dispositivos enfriadores desarrollados y un electrodo de estimulación con el que se indujo la FV a

frecuencias crecientes. En la *Figura 4.14*, se muestra el aspecto de estos dispositivos y su situación en un experimento. Se conectaron los tres electrodos de registro de los dispositivos al sistema de adquisición *MapTech*. Se realizaron variantes cerrando de forma transitoria la perfusión principal con objeto de reducir al máximo la temperatura de los dispositivos. Se redujo la temperatura al límite de su capacidad en todos los dispositivos. Durante el experimento, se observaron los electrogramas en tiempo real prestando atención a determinar el instante que se alcanzara la reversión y las temperaturas a las que ello ocurría.

4.5.2 Enfriamiento por inmersión progresiva de la preparación

De este modo se realizaron dos experimentos en los que la preparación se sumergía en un vaso de Tyrode a 4 °C de forma progresiva en cuatro pasos, hasta alcanzar su inmersión completa. Se fijaron dos electrodos unipolares en la pared anterior y posterior del ventrículo izquierdo, que se conectaron al sistema de adquisición *MapTech*. Se monitorizaron los electrogramas registrados por dichos electrodos durante el protocolo experimental. Al igual que en el protocolo anterior se pretendía determinar en qué circunstancias se producía el cese de la FV mediante enfriamiento epicárdico gradual.

Capítulo 5. **Resultados**

Tras realizar los protocolos experimentales descritos en los dos capítulos anteriores en este capítulo se presentan los resultados obtenidos, organizándose en cinco apartados. El primero de ellos está ligado al Capítulo 3, tiene que ver con la caracterización del dispositivo desarrollado, concretamente con su comportamiento estático y dinámico, el alcance de las variaciones térmicas en la pared ventricular y la distribución térmica epicárdica. Los tres apartados siguientes constituyen un bloque relativo a parámetros electrofisiológicos registrados a diferentes temperaturas y bajo distintas situaciones: en ritmo sinusal, bajo estimulación programada y en fibrilación ventricular. El último apartado incluye los resultados de aplicar otros protocolos experimentales complementarios en los que no se utiliza el dispositivo descrito en el Capítulo 3 y que buscan revertir la FV.

Índice del capítulo

5.1 Características del dispositivo diseñado.....	149
5.1.1 Comportamiento estático de las variaciones térmicas.....	149
5.1.2 Comportamiento dinámico de las variaciones térmicas	152
5.1.3 Alcance de las variaciones térmicas en la pared ventricular	153
5.1.4 Distribución térmica epicárdica.....	153
5.2 Intervalo QT en ritmo sinusal.....	154
5.3 Estimulación programada. Inducibilidad de la FV.....	156
5.3.1 Determinación de las respuestas repetitivas	156
5.3.2 Inducción de FV	157
5.4 Parámetros electrofisiológicos en FV	157
5.4.1 Intervalo VV de la FV	158
5.4.2 Indicador de refractariedad.....	160
5.4.3 Velocidad de conducción en FV	164
5.4.4 Longitud de onda en FV	165
5.4.5 Complejidad de la activación	166
5.5 Exploración de la reversión de la FV	169
5.5.1 Aplicación de dispositivos enfriadores	169
5.5.2 Enfriamiento por inmersión progresiva.....	169

5.1 Características del dispositivo diseñado

El margen de temperatura factible ($n=3$), en ausencia de problemas de reproducibilidad, se estableció entre 42°C y 22 °C. La temperatura, según el protocolo concreto, ha sido modificada entre dicho margen en escalones de 5 °C. En el rango mencionado se alcanza la temperatura con relativa rapidez, empleando de dos a tres minutos por escalón y manteniéndose estable en un margen de ± 0.2 °C una vez alcanzada. En las pruebas preliminares se llegaron a registrar temperaturas epicárdicas inferiores a 17 °C, no siendo este límite reproducible pues depende de las condiciones ambientales y de la propia preparación. En general es posible llegar a dicha temperatura cuando el líquido refrigerante se encuentra a una temperatura no superior a 0 °C, es decir, durante los primeros momentos de la realización del protocolo experimental descrito en el apartado 4.4. También es posible superar ampliamente sin problemas la temperatura de 42°C pero no tiene sentido por las lesiones irreversibles que ello provocaría en el tejido.

5.1.1 Comportamiento estático de las variaciones térmicas

En la *Tabla 5.1* se muestran las temperaturas registradas ($n=10$) en la realización del protocolo experimental especificado en el apartado 4.4.1, correspondiente al ritmo sinusal. La temperatura TM corresponde al termopar situado en la zona modificada y TN al de la zona no modificada. Tras realizar el análisis de varianza de un factor (ANOVA) a TN, los ligeros cambios observados en la zona de no actuación no son estadísticamente significativos ($p=0.50$). Dichos valores se representan en *Figura 5.1*.

Tabla 5.1 Temperaturas [°C] correspondientes a la zona modificada (TM) y a la no modificada (TN), registradas durante ritmo sinusal en los distintos escalones [°C]. Los valores son medias \pm desviación estándar ($n=10$). Diferencias no significativas en el conjunto de valores TN, [#] $p=0.50$

Escalón TM	TM	TN [#]
37	36.7 \pm 0.8	37.8 \pm 0.5
32	32.0 \pm 0.4	37.5 \pm 0.7
27	26.8 \pm 0.4	37.4 \pm 0.6
22	22.3 \pm 0.6	37.4 \pm 0.8
37	37.2 \pm 0.5	37.3 \pm 0.9
42	41.8 \pm 0.2	37.6 \pm 0.9
37	37.1 \pm 0.5	37.4 \pm 1.0

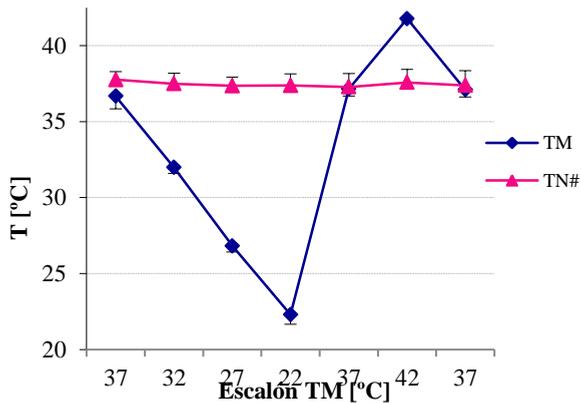


Figura 5.1 Evolución de la temperatura en la zona modificada TM y en la no modificada TN, registradas durante ritmo sinusal en los distintos escalones. Se representa el valor medio y la desviación estándar ($n=10$). Diferencias no significativas en el conjunto de valores TN, [#] $p=0.50$

De forma análoga, en la *Tabla 5.2* se muestran las temperaturas registradas ($n=10$) en la realización del protocolo experimental especificado

en el apartado 4.4.2, correspondiente a FV. Al aplicar el test ANOVA a TN, los ligeros cambios observados carecen de significación estadística ($p=0.88$). Dichos valores se representan en *Figura 5.2*.

Tabla 5.2 Temperaturas [°C] correspondientes a la zona modificada (TM) y a la no modificada (TN), registradas durante FV en los distintos escalones [°C]. Los valores son medias \pm desviación estándar ($n=10$). Diferencias no significativas en el conjunto de valores TN, $^{\#}p=0.88$

Escalón TM	TM	TN [#]
37	37.3 \pm 0.4	37.5 \pm 1.3
32	31.9 \pm 0.2	37.9 \pm 0.3
27	27.0 \pm 0.1	37.6 \pm 0.8
22	22.1 \pm 0.2	37.4 \pm 0.9
37	37.2 \pm 0.4	37.7 \pm 0.7
42	42.0 \pm 0.5	37.8 \pm 0.6
37	37.2 \pm 0.4	37.7 \pm 0.6

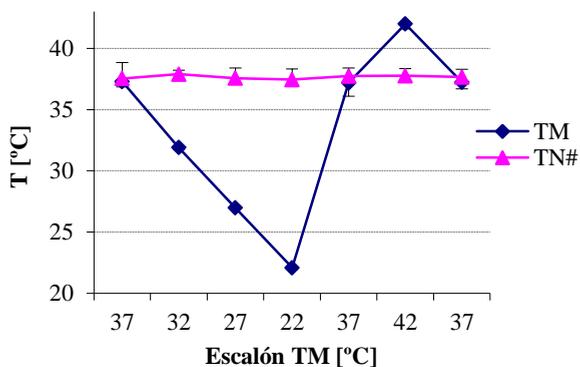


Figura 5.2 Evolución de la temperatura en la zona modificada TM y en la no modificada TN, registradas durante FV en los distintos escalones. Se representa el valor medio y la desviación estándar ($n=10$). Diferencias no significativas en el conjunto de valores TN, $^{\#}p=0.88$

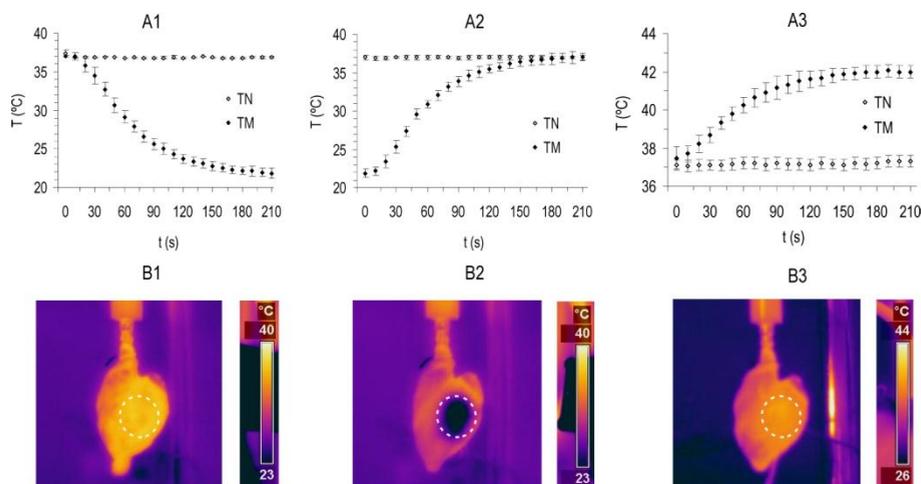


Figura 5.3. Evolución de la temperatura (media y desviación estándar, $n=3$) en el área modificada por el electrodo (TM) y en la zona no modificada (TN) durante el escalón de temperatura basal- hipotermia (A1), de hipotermia-basal (A2) y de basal-hipertermia (A3). Imágenes térmicas del corazón aislado en las que se aprecia la zona cubierta por el electrodo modificador (área estimada en línea discontinua), correspondientes a la temperatura basal (B1), a 22 ° C, en hipotermia (B2) y a 42 ° C en hipertermia (B3). Todas obtenidas a ritmo sinusal.

5.1.2 Comportamiento dinámico de las variaciones térmicas

Con los resultados obtenidos de aplicar el protocolo descrito en los subapartados 3.4.1, 3.4.2 y 3.4.4 se confeccionaron las curvas que se muestran en la Figura 5.3. El comportamiento dinámico se ajusta a una curva exponencial ($r < 0.95$, $p < 0.0001$) cuya constante de tiempo es 44.2 ± 3.3 s en el escalón de la situación basal a hipotermia), 46.6 ± 4.3 s de hipotermia a basal, y 60.2 ± 8.0 s de basal a hipertermia ($n=3$).

5.1.3 Alcance de las variaciones térmicas en la pared ventricular

La Tabla 5.3 contiene las temperaturas a lo largo de la pared ventricular a cuatro temperaturas epicárdicas diferentes resultado de aplicar los protocolos de los subapartados 3.4.1 y 3.4.3.

Tabla 5.3. Temperaturas [°C] registradas simultáneamente en el epicardio de la zona modificada (TM), a lo largo de la pared ventricular de esta área a una profundidad de 1 mm (T1), 2 mm (T2), 3 mm (T3), y en el epicardio de la zona no modificada (TN), en cuatro situaciones: a) sin actuar el electrodo modificador, b, c) en hipotermia, y d) en hipertermia. Los valores son medias \pm desviación estándar ($n=3$). Diferencias significativas respecto a “a)”, * $p<0.05$

	TM	T1	T2	T3	TN
a)	37.2 \pm 0.2	37.8 \pm 0.7	37.7 \pm 0.8	38.2 \pm 0.3	37.0 \pm 0.6
b)	33.2 \pm 0.8*	37.5 \pm 0.2	37.6 \pm 0.6	38.2 \pm 0.4	36.9 \pm 0.5
c)	27.3 \pm 0.6*	37.2 \pm 0.2	37.5 \pm 0.8	38.2 \pm 0.4	37.0 \pm 0.5
d)	41.9 \pm 0.1*	38.9 \pm 0.7*	38.2 \pm 0.6	38.3 \pm 0.3	37.2 \pm 0.2

5.1.4 Distribución térmica epicárdica

Las imágenes térmicas de la *Figura 5.3* muestran las variaciones de temperatura epicárdicas generadas por el electrodo modificador resultado de aplicar los protocolos de los subapartados 3.4.1 y 3.4.4.

Para la obtención de los resultados que se presentan en los siguientes tres apartados se han estudiado un total de once preparaciones válidas. El peso medio de los animales fue 2.5 \pm 0.3 kg, y el de las preparaciones experimentales obtenidas 8.9 \pm 1.5 g.

5.2 Intervalo QT en ritmo sinusal

Tras la ejecución del protocolo descrito en el subapartado 4.4.1, se determinó este parámetro aplicando el procedimiento expuesto en el subapartado 4.2.1. En *Figura 5.4* se muestran electrogramas correspondientes a un experimento, de un canal situado en la zona modificada y otro en la no modificada, a temperatura de perfusión, hipotermia e hipertermia, sobre los mismos se ha marcado el intervalo QT.

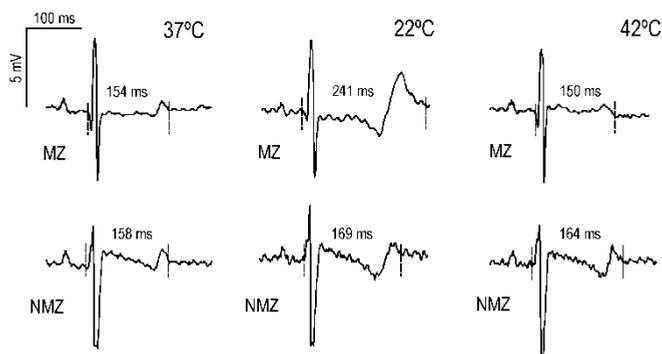


Figura 5.4 Electrogramas con las marcas del QT de un determinado experimento. MZ corresponde al registrado por un canal de la zona modificada, NMZ al de la zona normotérmica, ambos en condiciones de control (37°C), hipotermia (22°C) e hipertermia (42°C).

Los resultados de QT en el área modificada (QTM) y no modificada (QTN) en cada escalón de temperatura se muestran en la *Tabla 5.4*, se han representado en la *Figura 5.5*. La comparación entre pares de valores de QTM respecto a Escalón TM “37” ofrece significación estadística ($p < 0.01$), mientras que no la hay en los valores de QTN respecto a Escalón TM “37”.

Tabla 5.4 Intervalos QT [ms] correspondientes a la zona modificada (QTM) y a la no modificada (QTN), para distintos escalones [°C]. Los valores son medias \pm desviación estándar ($n=10$). Diferencias significativas respecto a Escalón TM “37”, * $p<0.01$

Escalón TM	QTM	QTN
37	149 \pm 12	146 \pm 13
32	171 \pm 23*	148 \pm 15
27	187 \pm 35*	153 \pm 20
22	195 \pm 47*	156 \pm 26
37	151 \pm 19	153 \pm 23
42	143 \pm 18*	152 \pm 20
37	152 \pm 27	154 \pm 22

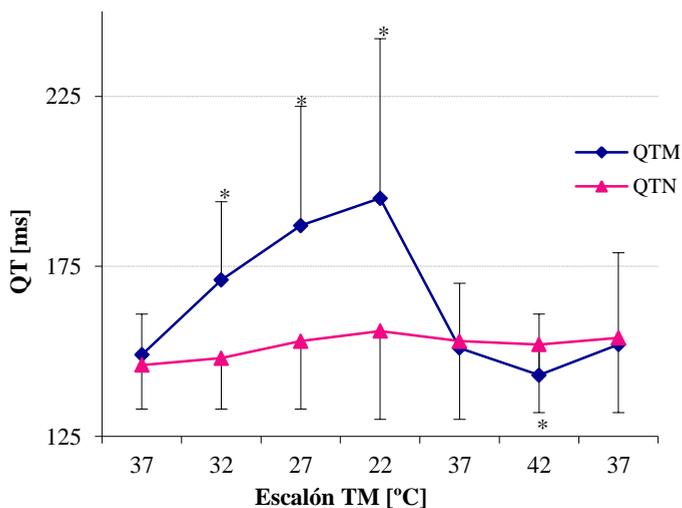


Figura 5.5 Evolución del intervalo QT en la zona modificada TM y en la no modificada TN, en los distintos escalones ($n=10$) Representación de los valores de la Tabla 5.4. Diferencias significativas respecto a Escalón TM “37”, * $p<0.01$

En la Figura 5.6 se representa el intervalo QT en la zona modificada (61 determinaciones, $n=10$) frente a la temperatura de dicha zona. El método de mínimos cuadrados ofrece un ajuste lineal QTM-TM ($r=-0.67$, $p<0.0001$).

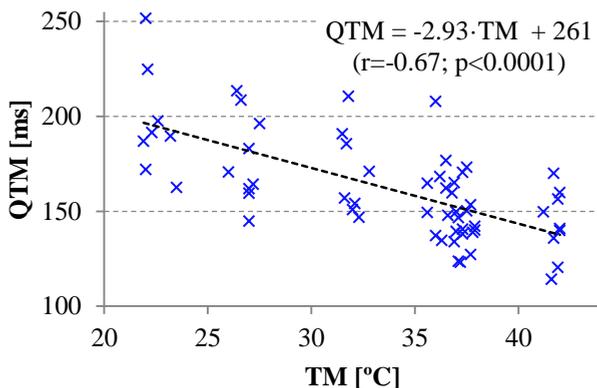


Figura 5.6 Diagrama de dispersión del intervalo QT en la zona modificada (QTM) con la temperatura (TM), y recta obtenida tras realizar la regresión lineal (61 puntos, $n=10$) con el resultado del ajuste.

5.3 Estimulación programada. Inducibilidad de la FV

Tras la ejecución del protocolo descrito en el subapartado 4.4.1, se realizaron estas determinaciones para determinar la presencia de respuestas repetitivas y la inducción de FV en los términos recogidos en el subapartado 4.2.2.

5.3.1 Determinación de las respuestas repetitivas

Se observó la presencia de respuestas repetitivas en cinco de once experimentos. Tras la realización de la prueba Chi-cuadrado para tablas de contingencia no se ha encontrado dependencia entre la aparición de

respuestas repetitivas y las condiciones tanto de hipotermia como de hipertermia inducidas localmente ($p>0.34$).

5.3.2 Inducción de FV

Se observó la aparición de FV inducida por estimulación eléctrica en uno de once experimentos, fue en condiciones de hipotermia. La prueba Chi-cuadrado no ofreció dependencia entre la aparición de FV y la hipotermia inducida localmente ($p>0.30$).

5.4 Parámetros electrofisiológicos en FV

Los parámetros electrofisiológicos del presente apartado se han obtenido tras realizar del protocolo experimental del subapartado 4.4.2, su definición y determinación se describe en el subapartado 4.2.3.

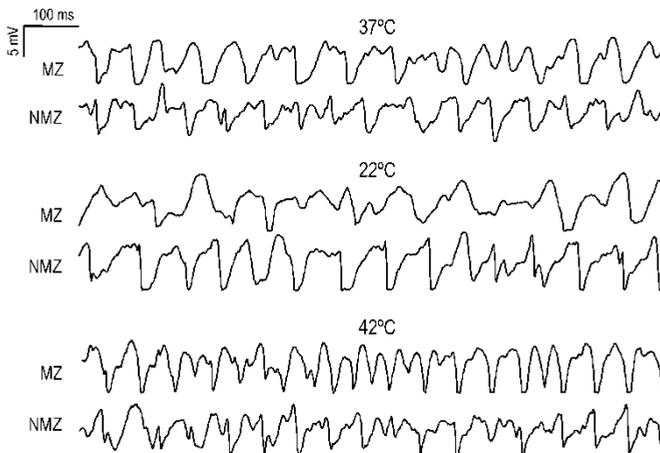


Figura 5.7 Electrogramas en FV obtenidos a diferentes temperaturas en la zona modificada por el electrodo (MZ) y la no modificada (NMZ).

5.4.1 Intervalo VV de la FV

En *Figura 5.7* se muestran electrogramas correspondientes a un experimento, de un canal situado en la zona modificada y otro en la no modificada, a temperatura de perfusión, hipotermia e hipertermia.

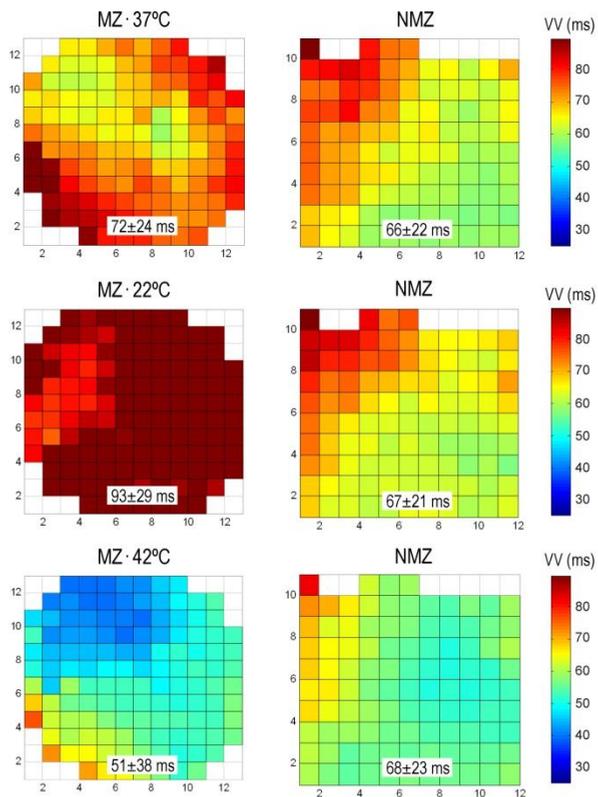


Figura 5.8 Mapas de intervalos VV en FV en ambas zonas a diferentes temperaturas, con indicación del valor medio y la desviación estándar.

De forma análoga, los mapas representados en la *Figura 5.8* corresponden a la representación del intervalo VV promedio en un segmento de 8 s de cada uno de los canales que conforman las matrices de ambos

electrodos multipolares. En cada mapa se muestra el valor numérico del promedio de todos los intervalos determinados.

Tabla 5.5 Intervalo VV [ms] en FV en la zona modificada (VVM) y en la no modificada (VVN), en distintos escalones [°C]. Los valores son medias \pm desviación estándar ($n=10$). En VVM se encuentran diferencias significativas globalmente y en determinados valores respecto a Escalón TM “37”, $*p<0.05$.

Escalón TM	VVM*	VVN
37	52 \pm 10	52 \pm 9
32	55 \pm 13	51 \pm 8
27	60 \pm 13*	51 \pm 10
22	65 \pm 16*	53 \pm 9
37	52 \pm 7	52 \pm 7
42	44 \pm 7*	51 \pm 6
37	48 \pm 8	51 \pm 6

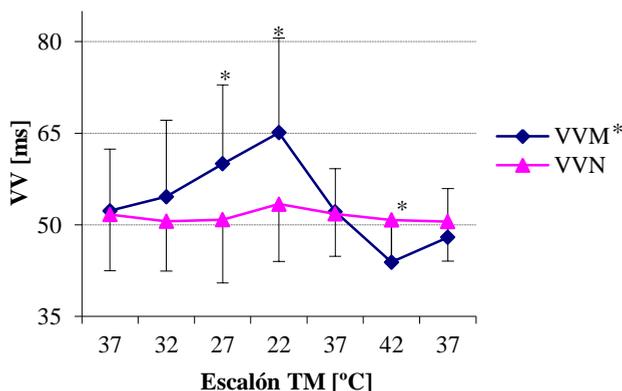


Figura 5.9 Intervalo VV en FV en la zona modificada (VVM) y en la no modificada (VVN), en distintos escalones. Se representa el valor medio y la desviación estándar ($n=10$). En VVM se encuentran diferencias significativas globalmente y en determinados valores respecto a Escalón TM “37”, $*p<0.05$

En la *Tabla 5.5* se muestran los valores medios del intervalo VV en segmentos de 8s ($n=10$), tanto en la zona modificada como en la no

modificada. Al aplicar el test ANOVA al conjunto de datos, se observa que las diferencias son significativas para VVM ($p < 0.01$) y no lo son para VVN. La comparación entre pares ofrece significación estadística en las diferencias para determinados valores de VVM respecto a Escalón TM “37” ($p < 0.05$). La representación de dichos valores se muestra en *Figura 5.9*, en ella se puede apreciar la evolución de dicho parámetro con la temperatura.

En la *Figura 5.10* se representa el intervalo VV en la zona modificada (64 determinaciones, $n=10$) frente a la temperatura de dicha zona. El método de mínimos cuadrados ofrece un ajuste lineal VVM-TM ($r = -0.52$, $p < 0.0001$).

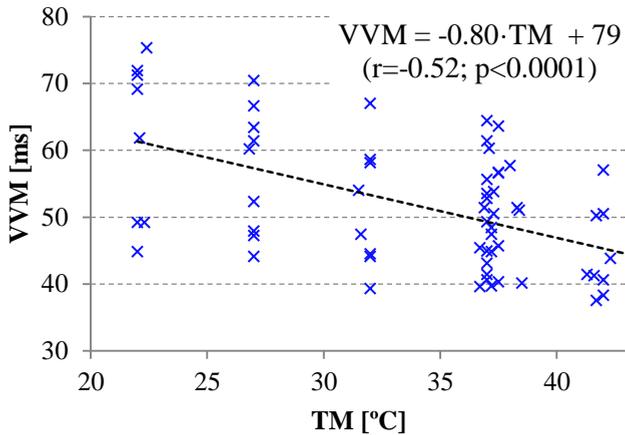


Figura 5.10 Diagrama de dispersión del intervalo VV en la zona modificada (VVM) con la temperatura (TM) y recta obtenida tras realizar la regresión lineal (61 puntos, $n=10$) con el resultado del ajuste.

5.4.2 Indicador de refractariedad

En la *Tabla 5.6* se muestran los valores medios del percentil 5 (Pct5) del histograma de intervalos VV en segmentos de 8 s ($n=10$), tanto en la zona

modificada como en la no modificada. Las diferencias en el conjunto de Pct5M son significativas ($p < 0.05$), mientras que no lo son para Pct5N.

Tabla 5.6 Percentil 5 del histograma de intervalos VV [ms] en FV, en la zona modificada (Pct5M) y en la no modificada (Pct5N), en distintos escalones [°C]. Los valores son medias \pm desviación estándar ($n=10$). Diferencias significativas en el conjunto de valores Pct5M, $*p < 0.05$

Escalón TM	Pct5M*	Pct5N
37	31.4 \pm 2.7	30.7 \pm 1.9
32	31.3 \pm 3.1	30.3 \pm 1.0
27	31.5 \pm 3.2	30.8 \pm 2.0
22	32.8 \pm 3.8	30.4 \pm 1.9
37	32.2 \pm 3.6	31.4 \pm 1.5
42	29.1 \pm 2.1	30.9 \pm 1.2
37	29.4 \pm 1.8	30.8 \pm 1.3

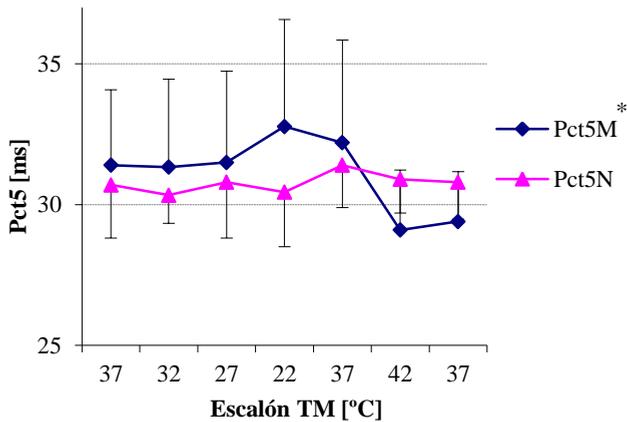


Figura 5.11 Percentil 5 (Pct5) del histograma de intervalos VV en FV, en la zona modificada (Pct5M) y en la no modificada (Pct5N), en distintos escalones. Se representa valor medio y desviación estándar ($n=10$). Diferencias significativas en el conjunto de valores Pct5M, $*p < 0.05$

La *Tabla 5.7* presenta los valores del Pct5 [ms] obtenidos en la zona modificada y la no modificada, en condiciones de control (a temperatura de perfusión, 37°C), hipotermia e hipertermia. Dichos valores se utilizan en la obtención de la longitud de onda del apartado 5.4.4. La *Figura 5.12* ofrece la representación de dichos valores. Las diferencias entre ambas zonas tanto en condiciones de hipotermia como en hipertermia son estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Tabla 5.7 Percentil 5 (Pct5) del histograma de intervalos VV [ms] en FV, en la zona modificada (Pct5M) y en la no modificada (Pct5N), y temperaturas respectivas registradas [°C], a la temperatura de perfusión, en hipotermia y en hipertermia. Los valores son medias \pm desviación estándar ($n=10$). Diferencias significativas en Pct5 entre ZM y ZN, $*p < 0.05$

TM	TN	Pct5M	Pct5N
37.4 \pm 0.5	37.5 \pm 1.2	31.4 \pm 2.7	30,7 \pm 1,9
22.5 \pm 1.5	37.5 \pm 0.8	32.8 \pm 3.8*	30.4 \pm 1.9
41.9 \pm 0.3	37.6 \pm 0.7	29.1 \pm 2.1*	30.9 \pm 1.2

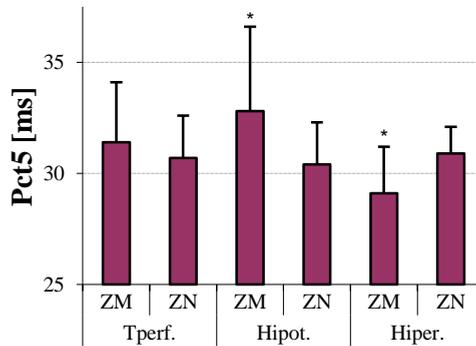


Figura 5.12 Percentil 5 (Pct5) del histograma de intervalos VV en FV, en la zona modificada (ZM) y en la normotérmica (ZN), a temperatura de perfusión, hipotermia e hipertermia. Se representa el valor medio y la desviación estándar ($n=10$). Diferencias significativas en Pct5 entre ZM y ZN, $*p < 0.05$

En la Figura 5.13 se representa el Percentil 5 de los intervalos VV en la zona modificada (64 determinaciones, n=10) frente a la temperatura de dicha zona. El método de mínimos cuadrados ofrece un ajuste lineal Pct5M-TM ($r=-0.39$, $p<0.002$).

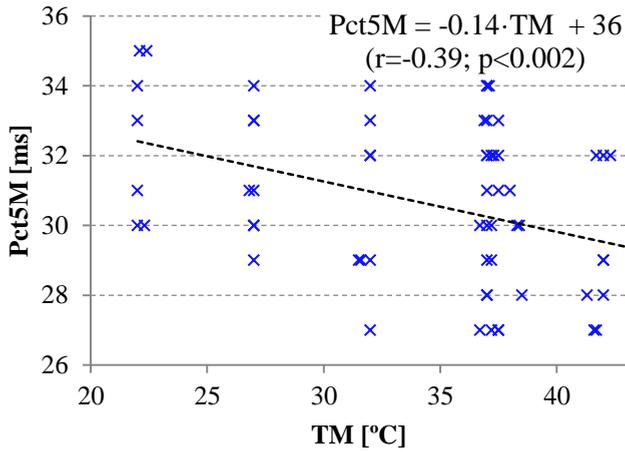


Figura 5.13 Diagrama de dispersión del Percentil 5 de los intervalos VV en la zona modificada (Pct5M) con la temperatura (TM), y recta obtenida tras realizar la regresión lineal (64 puntos, n=10) con el resultado del ajuste.

Tabla 5.8 Velocidad de conducción en FV [cm/s], en la zona modificada (VCM) y en la no modificada (VCN), y temperaturas respectivas registradas [°C], a temperatura de perfusión, hipotermia e hipertermia. Los valores son medias ± desviación estándar (n=10). Diferencias significativas en VC en ZM respecto a temperatura de perfusión en hipotermia e hipertermia, así como entre ZM y ZN, * $p<0.01$

TM	TN	VCM	VCN
37.4 ± 0.5	37.5 ± 1.2	54.8 ± 7.2	53.7 ± 6.5
22.5 ± 1.5	37.5 ± 0.8	47.1 ± 3.3*	54.7 ± 7.8
41.9 ± 0.3	37.6 ± 0.7	61.6 ± 5.4*	53.7 ± 6.2

5.4.3 Velocidad de conducción en FV

La *Figura 5.14* presenta los valores la velocidad de conducción obtenida en la zona modificada y la no modificada, en condiciones de control (a temperatura de perfusión, 37°C), hipotermia e hipertermia. La *Tabla 5.8* contiene los valores representados en la figura anterior. La comparación entre pares en la zona modificada en hipotermia respecto a la temperatura de perfusión proporciona significación a las diferencias de VC, con idéntico resultado en hipertermia ($p<0.01$). Análogamente también la hay entre una zona y otra en condiciones de hipotermia e hipertermia ($p<0.01$). No hay diferencias en el conjunto de valores VCN.

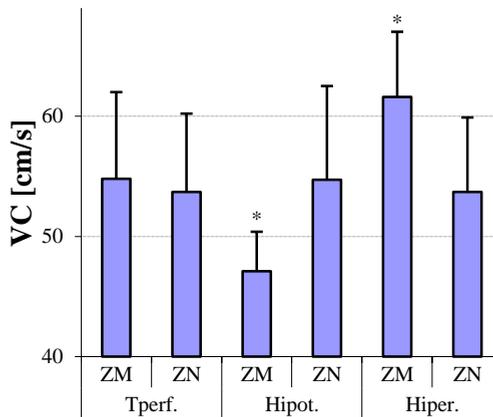


Figura 5.14 Velocidad de conducción en FV, en la zona modificada (ZM) y en la no modificada (ZN), a temperatura de perfusión, en hipotermia y en hipertermia. Se representa el valor medio y la desviación estándar ($n=10$). Diferencias significativas en VC en ZM respecto a temperatura de perfusión en hipotermia e hipertermia, así como entre ZM y ZN, * $p<0.01$

5.4.4 Longitud de onda en FV

La *Figura 5.15* presenta los valores de la longitud de onda obtenida en la zona modificada y la no modificada, como el producto entre la velocidad de conducción y el percentil 5 de los intervalos VV (subapartado 4.2.3), en condiciones de control (a temperatura de perfusión, 37°C), hipotermia e hipertermia. La *Tabla 5.9* contiene los valores representados en la citada figura. La comparación entre pares indica que las diferencias en LOM entre la temperatura de perfusión y la hipotermia son significativas ($p < 0.05$), no lo son en hipertermia, tampoco alcanzan significación en el conjunto de LOM ($p = 0.056$).

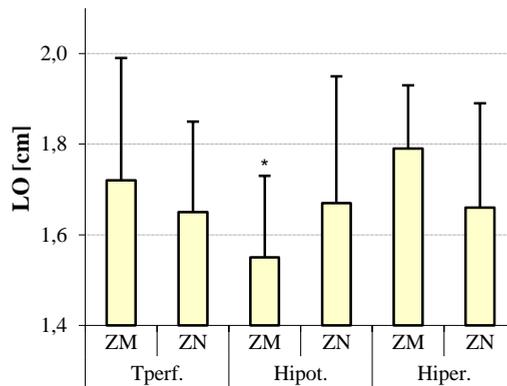


Figura 5.15 Longitud de onda (LO) en FV, en la zona modificada (ZM) y en la no modificada (ZN), a la temperatura de perfusión, en hipotermia y en hipertermia. Se representa el valor medio y la desviación estándar ($n = 10$). Diferencias significativas en LOM en hipotermia respecto a temperatura de perfusión, * $p < 0.05$

Tabla 5.9 Longitud de onda (LO) [cm] en FV, en la zona modificada (LOM) y en la no modificada (LON), y temperaturas respectivas registradas [°C], a temperatura de perfusión, hipotermia e hipertermia. Los valores son medias \pm desviación estándar ($n=10$). Diferencias significativas en LOM en hipotermia respecto a temperatura de perfusión, * $p<0.05$

TM	TN	LOM	LON
37.4 \pm 0.5	37.5 \pm 1.2	1.72 \pm 0.27	1.65 \pm 0.2
22.5 \pm 1.5	37.5 \pm 0.8	1.54 \pm 0.18*	1.67 \pm 0.29
41.9 \pm 0.3	37.6 \pm 0.7	1.85 \pm 0.09	1.64 \pm 0.24

5.4.5 Complejidad de la activación

Siguiendo el protocolo descrito en subapartado 4.2.3, se analizaron 1200 mapas de activación ($n=10$), en los que se observaron 3180 patrones de activación.

Tabla 5.10 Número y porcentaje de patrones observados (FRN: frentes de onda simples, REN: reentradas, AFL: afloramientos y COL: colisiones) en los mapas de activación en FV, en la zona modificada (ZM) y en la no modificada (ZN), a la temperatura de perfusión, en hipotermia y en hipertermia ($n=10$)

		FRN	REN	AFL	COL
Tperf.	ZM	419 (81%)	28 (5%)	34 (7%)	37 (7%)
	ZN	420 (82%)	15 (3%)	40 (8%)	34 (7%)
Hipot.	ZM	463 (78%)	15 (3%)	50 (8%)	63 (11%)
	ZN	394 (77%)	21 (4%)	45 (9%)	53 (10%)
Hiper.	ZM	395 (75%)	22 (5%)	53 (10%)	54 (10%)
	ZN	433 (82%)	21 (4%)	29 (6%)	42 (8%)

En la *Tabla 5.10* se ofrecen los resultados de la cantidad de patrones de activación observados, tanto en valor absoluto como en valor relativo respecto al total de la observación: temperatura y zona. La representación de los porcentajes se muestra en la *Figura 5.16*. Se agruparon los datos en tablas de contingencia, del resultado de la prueba Chi-cuadrado se desprende que en la zona modificada existe relación entre los tipos de patrones y la temperatura ($p < 0.05$).

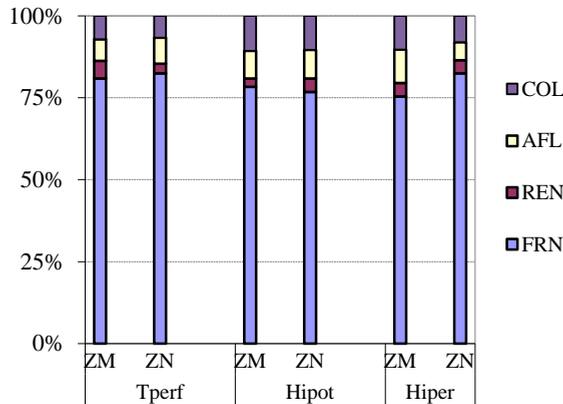


Figura 5.16 Representación de la cantidad de patrones observados (frentes de onda simples, reentradas, afloramientos y colisiones) en los mapas de activación en FV, en la zona modificada (ZM) y en la no modificada (ZN), a la temperatura de perfusión, en hipotermia y en hipertermia ($n=10$)

Los resultados de la tipificación de la complejidad de la activación se muestran en la *Tabla 5.11* y en la *Figura 5.17*. Se agruparon los datos en tablas de contingencia, del resultado de la prueba Chi-cuadrado se desprende que en ZM hay interrelación entre complejidad y temperatura ($p < 0.05$), existiendo dependencia entre complejidad y zonas durante la hipotermia ($p < 0.01$).

Tabla 5.11 Número de mapas de activación en FV clasificados atendiendo a su complejidad y porcentaje de patrones observados (Tipo I, Tipo II, Tipo III) y porcentaje de los mismos, en la zona modificada (ZM) y en la no modificada (ZN), a la temperatura de perfusión, en hipotermia y en hipertermia ($n=10$)

		Tipo I	Tipo II	Tipo III
Tperf	ZM	10 (5%)	87 (44%)	103 (52%)
	ZN	17 (9%)	78 (39%)	105 (53%)
Hipot	ZM	13 (7%)	64 (32%)	123 (61%)
	ZN	14 (7%)	94 (47%)	92 (46%)
Hiper	ZM	20 (10%)	80 (40%)	100 (50%)
	ZN	17 (9%)	93 (46%)	90 (45%)

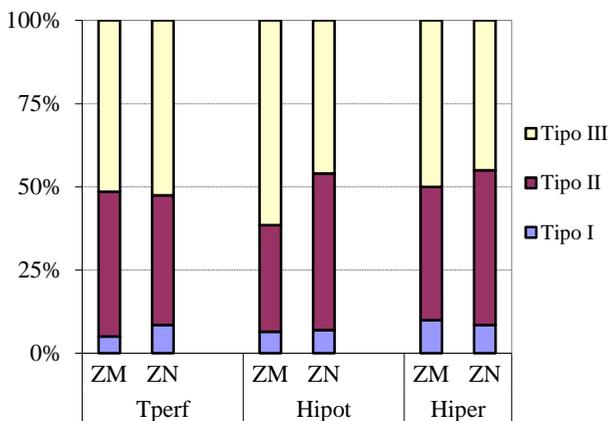


Figura 5.17 Representación de la tipificación de la complejidad de la activación de los mapas en FV, en la zona modificada (ZM) y en la no modificada (ZN), a la temperatura de perfusión, en hipotermia y en hipertermia ($n=10$)

En el presente subapartado, la temperatura ($n=10$) de la zona modificada y de la no modificada a la temperatura de perfusión fue respectivamente: 37.4 ± 0.5 °C y 37.5 ± 1.2 °C; en hipotermia 22.5 ± 1.5 °C y 37.5 ± 0.8 °C; y en hipertermia 41.9 ± 0.3 °C y 37.6 ± 0.7 °C.

5.5 Exploración de la reversión de la FV

5.5.1 Aplicación de dispositivos enfriadores

En los dos experimentos realizados siguiendo el protocolo especificado en 4.5.2 no se consiguió el cese de la FV.

5.5.2 Enfriamiento por inmersión progresiva

Se realizaron dos experimentos siguiendo el protocolo descrito en 4.5.3, en ningún momento cesó la FV, salvo en condiciones de total inmersión de la preparación y con la perfusión de Tyrode cerrada transcurridos dos minutos.

Capítulo 6. **Discusión**

En el presente capítulo se discuten los resultados expuestos en el capítulo anterior. El primero de los apartados se centra en los aspectos metodológicos empleados en la presente investigación. El siguiente apartado trata sobre el dispositivo desarrollado y en qué medida satisface las exigencias planteadas inicialmente. En el tercero se examinan los efectos de la hipotermia e hipertermia locales sobre las variables electrofisiológicas analizadas y sus implicaciones sobre las propiedades del miocardio, y también se comentan los resultados obtenidos en la exploración de procedimientos encaminados a la reversión de FV mediante enfriamiento progresivo y selectivo epicárdico. Finalmente, tras exponer las limitaciones de la presente investigación se proponen unas futuras líneas de trabajo.

Índice del capítulo

6.1 Comentarios sobre la metodología empleada.....	175
6.1.1 Preparación de corazón aislado de conejo.....	175
6.1.2 Sobre el planteamiento metodológico general	177
6.2 Evaluación del dispositivo desarrollado.....	178
6.2.1 Comportamiento estático de las variaciones térmicas.....	179
6.2.2 Comportamiento dinámico de las variaciones térmicas	179
6.2.3 Alcance de las variaciones térmicas en la pared ventricular	180
6.2.4 Distribución térmica epicárdica	182
6.2.5 Calidad de los registros obtenidos.....	183
6.2.6 Aspectos constructivos	184
6.3 Efectos de las modificaciones locales de temperatura	185
6.3.1 Variación del intervalo QT.....	185
6.3.2 Aparición de respuestas repetitivas	187
6.3.3 Variación en la velocidad de conducción en FV	188
6.3.4 Modificación en el intervalo VV, refractariedad y longitud de onda en FV	189
6.3.5 Afectación en los patrones de activación en FV	193
6.3.6 Reversión de la FV mediante enfriamiento.....	195
6.4 Limitaciones del estudio.....	196
6.5 Futuras líneas de trabajo.....	197

6.1 Comentarios sobre la metodología empleada

6.1.1 Preparación de corazón aislado de conejo

Esta investigación se ha basado en un modelo experimental consistente en una preparación de corazón aislado y perfundido de conejo tipo Langendorff. Es una técnica muy clásica, descrita por Oscar Langendorf en 1895. Entre sus ventajas más destacables está la reproducibilidad y reducido costo, mientras que su limitación principal está en reproducir una situación aislada del resto del organismo.

En la investigación, se ha considerado que no tienen una repercusión directa en los parámetros analizados algunos factores inherentes a la técnica, tales como la ausencia de factores reguladores extrínsecos (nervios centrales y/o humorales), la sustitución de la sangre por Tyrode, o el hecho de trabajar en vacío –en ausencia de la carga mecánica que supone el bombeo sanguíneo. Es más, resultaría beneficioso al separar su posible afectación por la variable principal objeto del estudio, la temperatura. En la realización de los protocolos experimentales, la perfusión ininterrumpida, la ausencia de fármacos, o lesiones como las secundarias a la isquemia minimizan el deterioro metabólico de la preparación, a la vez que focaliza el estudio la variable seleccionada. Abundando en ello, el hecho de que el corazón esté aislado y perfundido con Tyrode, permite asentar que los cambios observados en los parámetros electrofisiológicos analizados son atribuibles a las modificaciones térmicas locales inducidas, sin haber mediado otros factores como los mencionados.

La especie animal utilizada ha sido el conejo, se han empleado ejemplares criados en condiciones controladas destinados a fines de experimentación animal y se han atendido las legislaciones estatal y europea al respecto. Sobre estas preparaciones se han reproducido estados como ritmo sinusal, estrés mediante estimulación programada o fibrilación ventricular. Respecto a esta última, es importante disponer de un corazón al que se pueda inducir fácilmente la arritmia y que ésta se mantenga una vez instaurada. En el caso del conejo, su mayor masa y menor frecuencia, mejoran las características respecto a ratas o pequeños roedores de cara a la investigación de los mecanismos que desencadenan la FV.

Los modelos de corazón aislado de conejo han sido empleados ampliamente en el estudio de la electrofisiología cardíaca y concretamente en el de las arritmias ventriculares, como el caso que nos ocupa [Jalife and Gray 1996, Ravelli and Allessie 1997]. No obstante, la extrapolación de los hallazgos al ser humano, siempre debe tener en cuenta las diferencias interespecies [Janse et al 1998, Romero et al 2010].

El grupo con el que se ha llevado a cabo la investigación dispone de una dilatada experiencia en estudios basados en este tipo de preparaciones. En estos estudios se ha analizado la afectación que sobre la electrofisiología miocárdica tienen agentes tales como el ejercicio físico [Such et al 2008], fármacos [Chorro et al 2000], temperatura [Tormos et al 2008], estiramiento [Trapero et al 2008], isquemia [Chorro et al 1998] o lesiones mediante ablación [Chorro et al 2012].

6.1.2 Sobre el planteamiento metodológico general

El diseño del protocolo experimental ha permitido disponer de datos registrados en la zona alterada térmicamente y en la normotérmica, en diferentes condiciones: temperatura de perfusión, hipotermia e hipertermia, e incluso variando gradualmente la temperatura, en distintos estados: ritmo sinusal, estrés inducido mediante estimulación programada o fibrilación ventricular. Ello ha facilitado el análisis de los parámetros electrofisiológicos realizando comparaciones entre zonas o a diferentes temperaturas a partir de los cuales se han extraído las conclusiones.

La realización de la investigación en su parte experimental requería el desarrollo previo del dispositivo electrodo multipolar modificador de la temperatura y su validación. Lo que ha constituido una parte no desdeñable en el conjunto de trabajos realizados a lo largo de la investigación.

La realización de los protocolos experimentales ha requerido la participación de cardiólogos y fisiólogos que con su presencia han coordinado y ejecutado los trabajos más comprometidos. Dada la diversidad de datos a registrar (diferentes temperaturas en distintos estados), la duración de cada uno de los experimentos ha sido relativamente larga, en torno a tres o cuatro horas.

El análisis de los datos registrados para la determinación de los parámetros a estudiar precisó del adiestramiento previo y la revisión de artículos de investigación relacionados. Esta parte ha tenido una gran carga de trabajo. La automatización de algunas rutinas, como el marcado automático de las activaciones en FV mediante un algoritmo desarrollado al

efecto por ingenieros del grupo de investigación, ha aliviado en gran medida el trabajo a realizar.

El posterior estudio y extracción de conclusiones, al margen de constituir el resultado de la presente tesis doctoral, ha permitido presentar varias ponencias en diferentes congresos nacionales e internacionales, así como la publicación de un artículo en una revista científica listada en el JCR. En el momento de la redacción está en proyecto la realización de otras aportaciones.

6.2 Evaluación del dispositivo desarrollado

En el apartado 5.1 se presentaron los resultados relativos a la evaluación funcional del electrodo multipolar modificador de temperatura epicárdica. Allí se muestra su capacidad de inducir hipotermia e hipertermia controladas en un área del epicardio del ventrículo del corazón aislado y perfundido de conejo, y la de obtener registros simultáneos de alta densidad de la actividad eléctrica en dicha área con los que se pueden estudiar los cambios en la electrofisiología.

En los electrogramas mostrados en la *Figura 5.4* se aprecia el efecto de la inducción local de hipotermia y de hipertermia sobre el intervalo QT en condiciones de ritmo sinusal. Análogamente en la *Figura 5.7* se muestra el efecto sobre el intervalo VV en FV. Los resultados expuestos en el subapartado 5.4.5 que implican el análisis de mapas de activación se han obtenido en base a los datos registrados con el dispositivo desarrollado. Todo ello muestra su capacidad para crear heterogeneidades electrofisiológicas en el epicardio en condiciones de FV y efectuar registros simultáneos para su estudio.

6.2.1 Comportamiento estático de las variaciones térmicas

En las pruebas preliminares en las que se evaluó la capacidad de enfriamiento, la temperatura mínima epicárdica que de modo reproducible se pudo alcanzar fue de 22 ° C, estableciéndose como temperatura de hipotermia más acentuada para posteriores protocolos. Por otra parte, la operación del dispositivo en modo de calentamiento se limitó a 42 ° C, con el fin de evitar daños irreversibles en los tejidos. En trabajos previos [Tormos et al 2008], este rango se demostró útil –en el sentido de inducir alteraciones en la electrofisiología– y seguro para el modelo utilizado –se tenía reversibilidad de los efectos.

Tanto en ritmo sinusal (*Tabla 5.1*) como en condiciones de FV (*Tabla 5.2*): i) no hay dificultad en la consecución de los cambios de temperatura de la zona modificada en los puntos determinados dentro del rango establecido; la temperatura se puede fijar con suficiente precisión y se mantiene estable como se desprende de que la variabilidad en la zona alterada no es significativamente mayor que la del área normotérmica, ii) los cambios inducidos en la zona modificada no tienen efecto sobre la zona normotérmica. Esto último tiene especial importancia dado que el objetivo es conseguir modificaciones térmicas locales, frente a otros trabajos en que los cambios son globales [Harada et al 2008, Chorro et al 2002].

6.2.2 Comportamiento dinámico de las variaciones térmicas

Obtenida la respuesta de la temperatura modificada frente a cambios súbitos del sistema formado por la preparación experimental –en condiciones de

ritmo sinusal– y el dispositivo desarrollado: desde la situación basal a hipotermia máxima, de hipotermia máxima a basal y de basal a hipertermia, que se representan en la *Figura 5.3*, se ha comprobado que en todos los casos se ajusta bien a una curva exponencial, como se desprende del coeficiente de correlación obtenido. La constante de tiempo del sistema equivalente de primer orden toma valores entre 45 y 60 segundos. Estos tiempos son sensiblemente superiores a los alcanzados en otros trabajos [Chorro et al 2002] cuando el enfriamiento se efectuaba directamente sobre la perfusión con Tyrode a 4°C, lo que resulta razonable al tratarse esta vez de un método local y más indirecto. Transcurridos algo más de tres minutos la temperatura en la zona modificada alcanza el régimen estacionario, permaneciendo estable (± 0.2 °C). Mientras que en la zona no afectada por el electrodo no sufre cambios de temperatura. Mediante otros procedimientos, por ejemplo mediante la aplicación directa de un cuerpo frío con suficiente capacidad de extracción de calor, se podría conseguir una reducción local de temperatura más rápida o incluso de mayor intensidad, pero no se tendría opción al registro electrofisiológico y el control de temperatura sería considerablemente más complejo.

6.2.3 Alcance de las variaciones térmicas en la pared ventricular

Las temperaturas registradas a lo largo de la pared ventricular (*Tabla 5.3*) sugieren que el efecto térmico modificador del dispositivo sobre el tejido es eminentemente superficial, con reducida penetración intramural, especialmente durante la inducción de hipotermia. Ello supone una limitación en la profundidad de actuación térmica del método propuesto. Si bien en este estudio han quedado constatados y contrastados mediante

procedimientos de medida alternativos, no se disponen de datos de otros estudios similares –enfriamiento local sobre el mismo tipo de preparaciones– anteriores, dado que esta determinación no se había realizado [Tormos et al. 2008]. Tampoco se cuantificó el alcance en otros trabajos [Yamazaki et al. 2012, Boersma et al. 2002] que reproducen modelos bidimensionales basados en preparaciones similares a las que previamente se les practica una crioblación desde el endocardio ventricular de la que resulta una lámina epicárdica de alrededor de 1 mm de espesor.

La limitación en el reducido grado de hipotermia epicárdica respecto a trabajos anteriores [Tormos et al 2008], podría tener explicación por una parte por un efecto de "cuello de botella" en la extracción de calor a través de la resina epoxi –elemento que aglutina los hilos de los canales de registro– que se sitúa entre la célula Peltier y el epicardio ventricular. La conductividad térmica de dicha resina es notablemente superior a otras convencionales, su magnitud en términos absolutos sigue siendo moderada frente a otros materiales como los cerámicos. Por otra parte, la continua perfusión coronaria de líquido nutricio a temperatura basal proporcionada por el sistema de Langendorff, unida a la elevada vascularización miocárdica, con la consiguiente irrigación, supone un aporte intenso y continuado de calor en la zona que se pretende alterar térmicamente, que dificulta enormemente la consecución de dicho objetivo, especialmente en hipotermia. Esto último podría explicar la reducida profundidad de penetración de las modificaciones térmicas en nuestro modelo. El reducido espesor de los modelos bidimensionales comentados anteriormente facilitaría su enfriamiento, por lo que serían más acusados los efectos electrofisiológicos resultantes.

La técnica de medida de la temperatura empleada en el interior de la pared ventricular –se describe en el subapartado 3.4.3– incluye varios elementos sensores cuyo efecto de carga –por la simple presencia en la zona– podría estar ocasionando una interferencia local en la temperatura. Tanto en el caso de la aguja instrumentada como en el del termopar guiado, se está introduciendo un elemento metálico que, aún siendo en este caso de tamaño muy reducido, podría estar alterando la conducción de calor en el tejido. En el caso de la hipotermia inducida las medidas obtenidas podrían estar subestimando el verdadero valor de la temperatura. En nuestro caso pensamos que el efecto producido por la interferencia del sensor debe ser mínimo, pues las medidas realizadas con la aguja completa y con un único termopar desnudo no presentan diferencias.

6.2.4 Distribución térmica epicárdica

Las imágenes térmicas obtenidas (*Figura 5.3*) evidencian una distribución epicárdica uniforme en toda el área abarcada por el dispositivo, resultando especialmente patente en condiciones de hipotermia. Ello es compatible con la superficialidad del efecto modificador expuesto anteriormente. Se ha constatado que el método de determinación también ha sido empleado por otros grupos de investigación a tenor de los trabajos publicados recientemente [Harada et al 2008, Yamazaki et al 2012], los resultados allí obtenidos –en cuanto a uniformidad y área abarcada–, también son similares aunque se determinaron a una temperatura inferior.

6.2.5 Calidad de los registros obtenidos

A la vista de los electrogramas (*Figura 5.4* y *Figura 5.7*) obtenidos con el dispositivo diseñado –correspondientes a la zona modificada–, en cuanto a su amplitud no se observan diferencias respecto al electrodo convencional y la línea de base es estable, hechos que posibilitan la determinación de los parámetros de interés. Los electrogramas obtenidos muestran que la relación señal ruido se ve mejorada en el dispositivo diseñado, a pesar de la presencia de un dispositivo electrónico (célula Peltier) en las proximidades de la zona de registro. Ello podría atribuirse al cuidado blindaje de los mazos de hilos en el electrodo múltiple desarrollado y su conexión al terminal de tierra del laboratorio, conjuntamente con los instrumentos de alimentación, generación y medida utilizados en la realización de los protocolos experimentales.

Por otro lado, el dispositivo ha permitido la obtención de registros electrocartográficos en los que se ha analizado la dinámica de la activación, como muestran los resultados presentados en el subapartado 5.4.5. Con ello se han mejorado algunas limitaciones presentes en trabajos anteriores relacionados con la resolución y extensión espacial [Tormos et al 2008].

La superficie del dispositivo-electrodo desarrollado se ha conformado para adaptarse a la morfología del epicardio ventricular. Este hecho ha propiciado un buen contacto entre los canales de registro y la superficie epicárdica, ampliando así la zona de exploración respecto a electrodos de superficies planas. En algunos estudios anteriores se realizó dicha adaptación de la zona de registro [Boersma et al. 2002], aunque a diferencia del presente trabajo no se obtuvieron mapas de activación de alta resolución durante la FV en la zona modificada. Sin embargo, sí que ha supuesto una mejora respecto a trabajos anteriores [Tormos et al 2008],

puesto que en ocasiones, y debido en parte al constante movimiento de la preparación experimental y también a la forma plana de la superficie de registro, los canales periféricos de la matriz presentaban un contacto un tanto precario, con el consiguiente deterioro en la calidad y continuidad en las señales registradas.

6.2.6 Aspectos constructivos

En el desarrollo del dispositivo-electrodo no ha sido necesario recurrir a tecnologías específicas que suponen complejidad en la fabricación. Los materiales empleados han sido de fácil disponibilidad y los trabajos se han realizado por el propio grupo de investigación sin necesidad de encargar tareas externas.

El uso de resina, en la construcción del bloque que aglutina los hilos que constituyen los canales de registro, ha permitido la posterior conformación de la superficie de registro, con las ventajas expuestas anteriormente. El empleo de hilos aislados de acero inoxidable –material biocompatible– para los canales de registro, ha evitado la necesidad de procesos electroquímicos posteriores para mejorar las propiedades de las superficies de registro, operación que requiere otro tipo de metales.

Adicionalmente dicha concepción ha permitido integrar por un lado termopares para el registro de la temperatura, lo que ha proporcionado un método de medida de gran reproducibilidad, en especial de la temperatura epicárdica, sin interferir en el registro. También se integran electrodos de estimulación, que si bien no han sido utilizados en la presente investigación, aumentan la potencialidad en cuanto a protocolos experimentales realizables con este dispositivo.

La construcción de un dispositivo de este tipo se encuentra al alcance de cualquier grupo de investigación. Aunque conviene mencionar que, dado el elevado número de canales, determinadas fases en la construcción son bastante laboriosas. Por otro lado, la experiencia adquirida en este campo en el seno del grupo de investigación permitirá la realización de otros dispositivos similares en el futuro.

El sistema térmico del dispositivo cuyo elemento principal es la célula Peltier, y sobre el que se tenía la experiencia de trabajos anteriores [Tormos et al 2008], se ha mostrado efectivo. Sobre aquella concepción se han realizado algunas mejoras que han contribuido a optimizar el funcionamiento. Entre ellas el aislamiento térmico de los tubos de conducción y del vaso de expansión de líquido refrigerante o el empleo de un bloque de refrigeración líquida fabricado en cobre como intercambiador de calor entre la célula Peltier y dicho líquido.

La concepción modular de las distintas partes que integran el dispositivo, y el haber recurrido siempre que ha sido posible a elementos estandarizados disponibles en el mercado, ha permitido reducir costes y poder reemplazar partes, bien por avería o para mejorar las prestaciones iniciales.

6.3 Efectos de las modificaciones locales de temperatura

6.3.1 Variación del intervalo QT

En los registros obtenidos con el dispositivo desarrollado a diferentes temperaturas (*Figura 5.4*) se aprecia claramente el efecto de prolongación del QT inducido por el enfriamiento del epicardio, así como su reducción con el calentamiento.

Las modificaciones térmicas localizadas efectuadas de forma gradual y escalonada en el epicardio producen un progresivo aumento del intervalo QT en la zona modificada con el enfriamiento. De la misma manera, el calentamiento de la zona produce una reducción del QT. En ambos casos sin que aparezcan efectos apreciables en el QT de la zona no modificada. Dichos cambios inducidos en ambas situaciones desaparecen al volver a la temperatura de perfusión, lo que demuestra la reversibilidad del efecto (*Figura 5.5 y Tabla 5.4*).

En cuanto a la comparación entre zonas, los cambios observados entre ambas permiten afirmar que las modificaciones locales de temperatura efectuadas en la zona modificada alteran significativamente el intervalo QT respecto a la zona normotérmica.

La aplicación de hipotermia local ha conseguido prolongar el intervalo QT en el área modificada, sin alterarlo en la zona normotérmica. Esta situación ha dado lugar al origen de una heterogeneidad en los valores del QT del miocardio ventricular que es más acusada cuanto mayor es el gradiente térmico entre zonas. Análogamente la hipertermia local también aumenta la dispersión del QT al reducir el intervalo en la zona modificada.

Diversos estudios han atribuido a la dispersión del intervalo QT un efecto arritmogénico, como se expuso en el subapartado 1.8.1 [Zayas et al. 2000, Kramer and Zimetbaum 2011]. En el presente estudio se ha investigado la aparición de respuestas repetitivas ventriculares como indicador de la arritmogenicidad del sustrato miocárdico FV mediante un protocolo de estimulación programada [Josephson 2001, Zipes 2010]. La aplicación de estímulos con intervalo de acoplamiento corto en la proximidad de la zona alterada durante la realización de las modificaciones

térmicas no ha dado lugar a este tipo de respuestas, de lo que se desprende que en nuestro modelo la dispersión inducida en el intervalo QT no se ha traducido en un aumento de arritmogenicidad.

Los cambios introducidos en el epicardio no han sido capaces de instaurar condiciones arritmogénicas que se manifestaran en repuestas repetitivas o taquicardias ventriculares. Ello podría ser atribuido a una insuficiente dispersión del QT, cuyo origen estaría en el hecho de no haber abarcado zonas bastante amplias del miocardio, tanto en extensión como en profundidad o intensidad.

Aunque la dependencia del intervalo QT con la temperatura ya ha sido reportada por diversos autores [Davis 1993, Mortensen et al. 1993], la flexibilidad del método empleado para modificar la temperatura de forma gradual y controlada por encima y por debajo de la temperatura basal ha permitido analizar su dependencia con respecto a la temperatura. Se observa que existe una moderada correlación entre el intervalo QT de la zona modificada y la temperatura, y que dicha relación se ajusta a una recta (*Figura 5.6*).

6.3.2 Aparición de respuestas repetitivas

Como se ha comentado en el apartado anterior, tras inducir mediante modificaciones térmicas localizadas heterogeneidades en el QT, podría esperarse un aumento de la arritmogenicidad que se manifestara como respuestas repetitivas o incluso taquicardia ventricular al aplicar un protocolo de estimulación programada. De los resultados expuestos en el subapartado 5.3.1, se puede concluir que la presencia de respuestas repetitivas es independiente de las modificaciones térmicas realizadas. Así

mismo, de lo expuesto en el subapartado 5.3.2 se desprende que no existe dependencia entre la inducibilidad de la FV y las alteraciones térmicas locales.

En trabajos basados en modelos bidimensionales en los que se enfrió localmente el epicardio [Boersma et al. 2002] se indujeron taquicardias ventriculares. Esto podría tener explicación por tratarse de un modelo bidimensional, en el que la pérdida de vascularización resultado de la ablación practicada haría que el enfriamiento fuese más efectivo con la consecuente repercusión sobre la electrofisiología del tejido. Por otra parte, la activación en la lámina de tejido de 1 mm de grosor podría diferir sustancialmente de la que se tiene en el sustrato de nuestro modelo. En cualquier caso en nuestro modelo de alteración electrofisiológica las modificaciones térmicas locales no han evidenciado respuestas arritmogénicas, muy probablemente por ser insuficiente el grado de dispersión inducido en el QT.

6.3.3 Variación en la velocidad de conducción en FV

En la zona modificada la hipotermia ha dado lugar a un enlentecimiento de la conducción, mientras que la hipertermia tiene el efecto contrario (*Tabla 5.8, Figura 5.14*). Al comparar con la temperatura de perfusión, las diferencias observadas han alcanzado significación estadística, no así en la zona normotérmica.

Estos resultados son compatibles con los de Chorro et al. 2002, en condiciones de enfriamiento global y agudo –mediante instilación de Tyrode a 4°C en la perfusión principal. En este estudio se observó que unos instantes antes del cese de la FV se reduce la velocidad en un valor próximo al 60%

respecto a la basal. En nuestro caso fueron próximos al 15% en hipotermia local (22°C), la notable diferencia entre ambos es atribuible al método de enfriamiento aplicado en cada una de ellas, selectivo y acotado en un caso y global en el otro, y también a la mayor reducción de la temperatura obtenida en el primer caso. En ambos trabajos el valor de este parámetro en condiciones basales prácticamente es coincidente.

6.3.4 Modificación en el intervalo VV, refractariedad y longitud de onda en FV

- Modificación en el intervalo VV

Los electrogramas registrados a diferentes temperaturas con el dispositivo desarrollado (*Figura 5.7*) muestran claramente el efecto de prolongación del intervalo fibrilatorio inducido por el enfriamiento del epicardio y su reducción con el calentamiento. Dicho efecto se refleja individualmente en los canales distribuidos en el área de registro (*Figura 5.8*). Análogamente en la zona no modificada este parámetro prácticamente permanece inalterado (*Figura 5.7, Figura 5.8*).

El comportamiento del intervalo VV ante las modificaciones térmicas localizadas realizadas de forma gradual y escalonada muestran un progresivo aumento en la zona modificada con el enfriamiento y su reducción con el calor, sin que aparezcan sobre dicho parámetro efectos apreciables en la zona no modificada. Los cambios inducidos en ambas situaciones prácticamente han desaparecido al volver a la temperatura de perfusión, lo que demuestra su reversibilidad (*Figura 5.9 y Tabla 5.5*).

Los cambios observados en la zona modificada permiten afirmar que las modificaciones locales de temperatura alteran significativamente el

intervalo VV. Puesto que las reducidas diferencias en la zona normotérmica no son significativas, se deduce que los cambios térmicamente inducidos quedan confinados en la zona modificada (*Tabla 5.5*).

Como se comentó en el subapartado 1.6.3, la frecuencia de activación (FrD) es un parámetro alternativo al intervalo fibrilatorio (VV) por ser ambos representativos de un mismo fenómeno, estando ambos relacionados [Tormos 2006]. Si bien la información ofrecida por el VV resulta más próxima al propio fenómeno, la FrD es un parámetro de obtención más objetiva –el resultado de aplicar la FFT a un electrograma es único– frente al VV cuyo marcado previo, si se realiza manualmente no está exento de errores atribuibles al observador y si es automático requiere definir previamente unos criterios –que no son únicos ni universales– para identificar los instantes de activación. En el presente trabajo, desde el inicio se planteó el estudio de la complejidad de los mapas de activación ventricular en FV, y la determinación de dichos mapas requería el marcado previo de los instantes de activación sobre los electrogramas. Una vez obtenidos los instantes de activación, la determinación de la longitud media del ciclo fibrilatorio o intervalo fibrilatorio, es inmediata. Por dicha razón en este trabajo se ha optado por el análisis de este parámetro en lugar de la FrD. La tarea de determinación de los instantes de activación resulta sumamente ardua y tediosa cuando se realiza manualmente. En esta investigación se ha realizado mediante un algoritmo que ha permitido el marcado automático. Al margen de la consiguiente disminución en la carga de trabajo respecto al marcado manual, intrínsecamente el procedimiento empleado tiene la ventaja de ser un método de determinación con el que se eliminan errores atribuibles a la subjetividad del observador, tal como se ha comentado anteriormente.

La dependencia del intervalo VV con la temperatura ya ha sido reportada por diversos autores [Chorro et al. 2002, Tormos 2006]. Con el método empleado en el presente trabajo se ha encontrado una correlación moderada entre el intervalo VV en la zona modificada y la temperatura, ajustándose a una recta (*Figura 5.10*).

La temperatura modula el intervalo fibrilatorio en la zona modificada, lo prolonga en condiciones de hipotermia respecto a la temperatura de perfusión y lo reduce en hipertermia (*Tabla 5.5, Figura 5.9, Figura 5.10*), siendo reversibles dichos efectos. Este comportamiento es análogo al observado en el intervalo QT. Los resultados son consistentes con los obtenidos por nuestro grupo utilizando dispositivos distintos [Tormos et al 2008], lo que refuerza los resultados entonces obtenidos.

En definitiva, las modificaciones locales de temperatura han alterado significativamente el intervalo VV respecto a la zona normotérmica (*Tabla 5.5, Figura 5.9*).

- Efectos sobre la refractariedad

En la *Figura 5.11* se representan los datos de la *Tabla 5.5*, que corresponden al percentil 5 de los intervalos VV (Pct5), como indicador de refractariedad [Duytschaever et al 2001].

Al efectuar las modificaciones térmicas localizadas de forma gradual y escalonada, al igual que ocurriera con los intervalos QT y VV en la zona modificada, en el Pct5 existe una tendencia a prolongarse con la hipotermia y reducirse con la hipertermia, aunque en este caso el comportamiento no es tan claro. De cualquier modo, los incrementos en hipotermia y las reducciones en hipertermia que se observan en el Pct5 de la zona modificada

son significativos. El pequeño cambio del Pct5 en la zona modificada cuando se recupera la temperatura de perfusión tras las modificaciones realizadas no llega a alcanzar significación estadística. Las diferencias alcanzadas al modificar la temperatura en el conjunto de valores de Pct5 (zona modificada) tienen significación estadística, por lo que se puede afirmar que existe una relación entre este parámetro y la temperatura. Las variaciones en el Pct5 de la zona normotérmica no tienen significación estadística, es decir, la refractariedad en esa zona permanecería inalterada. Al ajustar linealmente la evolución del Pct5 con la temperatura el coeficiente de correlación es menor que los obtenidos para el QT y el VV (*Figura 5.13*).

Boersma et al. 2002, en un modelo 2D de la misma especie sometido a estimulación programada y enfriado localmente (15 °C), observaron incrementos en el periodo refractario funcional del 25% respecto a su valor basal, mientras que en nuestro caso sólo han llegado al 5%. Ambos modelos, aunque corresponden a la misma especie, tienen notables diferencias y las determinaciones se realizaron en situaciones distintas –en nuestro caso FV.

A la vista de los resultados del Pct5 obtenidos, el hecho de que tengan una relación más débil con la temperatura respecto a otros parámetros analizados en el presente trabajo, quizás pueda tener origen en que la determinación precisa de los instantes de activación, especialmente cuando los intervalos son cortos y/o las transiciones son de pendiente reducida, es compleja, incluso si el método empleado es automático como ha sucedido en el presente trabajo. Por otro lado el Pct5 es un indicador de refractariedad, no es propiamente el periodo refractario cuya determinación no está exenta de dificultad. En la determinación del Pct5 pueden influir las variaciones en la complejidad de los mapas de activación.

- Efectos sobre la longitud de onda

La longitud de onda en la zona modificada en condiciones de hipotermia sufre una ligera reducción con respecto a la zona normotérmica, mientras que en condiciones de hipertermia el efecto es el opuesto. Las diferencias en la zona modificada entre la hipotermia y la situación basal son significativas, no así en hipertermia (*Tabla 5.9, Figura 5.15*).

Anteriormente [Tormos 2006, Harada et al. 2008] se apreció cierta tendencia a reducir este parámetro con el enfriamiento, dichos resultados son congruentes con los ahora obtenidos.

6.3.5 Afectación en los patrones de activación en FV

En la presente investigación, para estudiar la influencia de la temperatura sobre la conducción ventricular durante la FV, se ha analizado la evolución de los mapas de isócronas correspondientes a ventanas de 100 ms obtenidos de segmentos de 2 s provenientes de registros de ambas zonas (modificada y normotérmica) para cada situación térmica (temperatura de perfusión, hipotermia e hipertermia). En primer lugar, a partir de la dinámica de las isócronas observada en los mapas, se han computado los patrones de activación presentes: frentes de onda simples, reentradas, afloramientos y colisiones. Posteriormente, en función de la cuantificación de los distintos patrones en cada mapa, se le ha asignado un grado de complejidad clasificándolo en tres niveles, en orden creciente: Tipo I, Tipo II y Tipo III. Esta metodología introducida por Konings [Konings et al. 1994], ha sido empleada por nuestro grupo en distintos trabajos [Chorro et al. 2002, Chorro et al. 2009, Guillem et al. 2009, Chorro et al. 2012]. Respecto a la identificación de los patrones a partir de los mapas obtenidos, conviene decir

que se trata de una tarea que requiere cierto adiestramiento previo y supervisión posterior por parte de expertos, no estando exenta de cierto grado de subjetividad en la interpretación de los mapas.

En relación con los patrones de activación observados en ambas zonas y bajo distintas situaciones térmicas, se aprecia en todas ellas un predominio de los frentes de onda, con presencia de colisiones y afloramientos, mientras que las reentradas son más residuales (*Tabla 5.10* y *Figura 5.16*). Individualmente la variabilidad en estos patrones es alta. No obstante, los resultados de las pruebas estadísticas indican que en la zona modificada existe relación entre el conjunto de los distintos tipos de patrones de activación observados y la temperatura.

Respecto a la complejidad de la activación, en la zona modificada en condiciones de hipotermia hay un incremento en los mapas de Tipo III y una reducción de en los de Tipo II, lo que se interpreta como un aumento en la complejidad de activación. Las pruebas realizadas indican que en la zona modificada existe interrelación entre el grado de complejidad y la temperatura. Así pues, la hipotermia local también induce diferencias en la complejidad entre ambas zonas (*Tabla 5.10* y *Figura 5.16*).

El sentido de estos cambios con la temperatura, es contrario al obtenido en estudios realizados con hipotermia global [Chorro et al. 2002]. En ese trabajo la hipotermia se conseguía mediante instilación directa de Tyrode frío (4 °C) en la perfusión, siendo por tanto unas condiciones notablemente distintas. Entonces, el enfriamiento agudo y global propiciaba un enlentecimiento gradual en la conducción que se traducía en una reducción de la complejidad, conducente al cese de la FV. Las condiciones en el presente estudio suponen un enfriamiento local y de menor intensidad.

Si los patrones de conducción registrados en la superficie se ven influenciados por zonas de tejido más amplias que las alteradas, las modificaciones electrofisiológicas con carácter predominantemente superficial darían lugar a heterogeneidades que en este caso no tendrían como consecuencia una reducción en la complejidad, sino un aumento.

La coexistencia de la zona superficial modificada con las zonas más profundas, afectadas en menor medida por la variación térmica, ha propiciado la interferencia de estas últimas dando lugar a patrones de activación heterogéneos y más complejos.

6.3.6 Reversión de la FV mediante enfriamiento

El enfriamiento selectivo y gradual mediante el empleo de dispositivos enfriadores epicárdicos, así como la inmersión progresiva no consiguieron revertir la arritmia en los experimentos (subapartados 5.5.1 y 5.5.2).

En trabajos anteriores [Chorro et al 2002] citados previamente, la instilación de Tyrode frío a través de la perfusión conducía a la reversión de la FV. Una posible explicación de que no fuera así en el presente trabajo podría encontrarse en la limitada penetración del enfriamiento epicárdico aplicado debido al alto grado de vascularización del miocardio y la elevada irrigación a que da lugar. En el presente trabajo en todo momento la perfusión principal se mantuvo abierta, con el consiguiente aporte continuado de Tyrode a 37 °C a través de las coronarias, en dichas condiciones con los procedimientos de enfriamiento epicárdico utilizados no se ha podido enfriar la preparación experimental globalmente de forma efectiva para revertir la arritmia. Por contrapartida, con la instilación de Tyrode frío a la perfusión que pasa directamente a las coronarias, se produce

un enfriamiento súbito y global del miocardio que conduce al paro cardiaco en pocos segundos. En este sentido el no haber alcanzado la reversión de la FV tendría explicación en una insuficiente cantidad de tejido enfriado, lo que se relacionaría con el concepto de la masa crítica necesaria para el mantenimiento de la FV [Garrey 1914].

Los resultados obtenidos sugieren que mediante procedimientos de actuación epicárdicos no es posible afectar a una masa miocárdica lo suficientemente extensa como para producir la reversión de la FV.

6.4 Limitaciones del estudio

Las modificaciones térmicas inducidas sobre el modelo experimental utilizado con el dispositivo desarrollado tienen un alcance intramural limitado. En este sentido ha sido difícil estudiar la relación entre la temperatura y propiedades que afectan al miocardio de forma más global, tal como sucede con los patrones de activación durante la FV.

La extensión y amplitud de las heterogeneidades producidas en el sustrato miocárdico no ha sido suficientemente extensa para propiciar la aparición de arritmias en forma de respuestas repetitivas ventriculares, taquicardias o FV. Por el contrario, el dispositivo y el protocolo experimental realizado han servido para encontrar la dependencia entre la variación localizada de temperatura y el efecto sobre el intervalo QT en la zona afectada. También durante la FV se ha obtenido la relación entre parámetros como el intervalo fibrilatorio (VV), el Pct5 (tomando este último como indicador de refractariedad), la velocidad de conducción y la longitud de onda.

Los registros realizados han sido epicárdicos. Para estudiar la conducción intramiocárdica en este tipo de preparaciones experimentales, podría ser de interés la realización de un electrodo múltiple capaz de registrar la actividad intramural y endocárdica. Una posible concepción sería en base a una matriz de líneas de electrodos unipolares que se insertarían en el miocardio, cada línea podría tener tres o cuatro hilos aislados a diferentes alturas que, junto con el resto de hilos del conjunto de líneas con la misma altura, conformarían diferentes planos de registro. Los registros proporcionarían una visión espacial de la conducción ventricular. No obstante un dispositivo de registro de este tipo tendría un claro efecto invasivo sobre la preparación –dado que supone la inserción en el miocardio ventricular de múltiples líneas relativamente próximas entre sí–, al margen que su construcción resultaría muy laboriosa.

El empleo de modelos experimentales de dos dimensiones en base a un corazón aislado al que previamente se le practica una ablación endocárdica y que dan lugar a una capa efectiva epicárdica de alrededor de 1 mm, y los estudios electrofisiológicos relacionados con la temperatura [Yamazaki et al 2012, Boersma et al 2002, Harada et al 2008] podría haber dado lugar a resultados más vistosos pero hay que tener presente la limitación de dicho modelo, que más bien se corresponde con una lámina de tejido ventricular sometida a perfusión.

6.5 Futuras líneas de trabajo

El presente trabajo ha evidenciado la reducida penetración del enfriamiento al ser aplicado de forma epicárdica y localizada. El dispositivo desarrollado permitirá continuar estudios en los que se analice de forma conjunta el efecto

de las modificaciones de la temperatura con fármacos antiarrítmicos, estiramiento miocárdico, presencia de zonas isquémicas etc.

La experiencia adquirida tras el desarrollo del dispositivo podría servir de ayuda para desarrollar otro dispositivo que permitiera la adquisición de registros intramurales con las características descritas en el apartado anterior. Las modificaciones térmicas podrían realizarse mediante protocolos de enfriamiento global y gradual de la preparación instilando Tyrode a diferentes temperaturas en la perfusión, dada la reducida penetración intramural del enfriamiento tópico que se ha constatado en esta investigación.

En relación con las características del proceso de conducción durante la FV, los resultados obtenidos invitan a seguir explorando mediante métodos alternativos que proporcionen una modulación más intensa con la temperatura. Ello se podría conseguir aplicando protocolos como los que se han descrito sobre enfriamiento global y gradual, y empleando bien un electrodo multipolar convencional, o utilizando un sistema óptico. Incluso podrían ser combinados, esto es, utilizando el dispositivo desarrollado con el propósito de mantener localmente condiciones diferentes a las globales.

El registro con el sistema óptico, permitiría utilizar durante los protocolos la termografía infrarroja para la determinación de la temperatura epicárdica. Ello ofrecería una relación precisa entre temperatura y la presencia de determinados patrones de activación y/o la complejidad resultante. Continuando con este planteamiento y en la línea de las determinaciones realizadas en el presente trabajo, en condiciones de estrés mediante estimulación eléctrica programada se podría analizar el efecto arritmogénico de la temperatura determinando la aparición de respuestas

repetitivas o taquicardias ventriculares, o la instauración de la FV. Podrían reproducirse distintas situaciones térmicas que indujeran la arritmogenicidad del sustrato. Ésta sería una forma de superar las limitaciones encontradas en el presente estudio y que se han atribuido al hecho de enfriar una masa de tejido insuficiente para conseguir algunos de los efectos buscados. En ritmo sinusal se podría determinar la heterogeneidad del QT con la temperatura y relacionarla con la arritmogenicidad estudiada anteriormente.

Capítulo 7. Conclusiones

A continuación se resumen las principales conclusiones del presente trabajo, relacionándolas con los objetivos particulares planteados en el apartado 2.3.

1. Desarrollar un dispositivo electrodo multipolar cuyos registros permitan la obtención de cartografía eléctrica epicárdica con capacidad de modular la temperatura local (hipotermia/hipertermia), para ser utilizado en estudios electrofisiológicos con corazón aislado de conejo. El sistema deberá validarse experimentalmente comprobando la capacidad de registrar mapas de activación epicárdica a temperaturas estables superiores e inferiores al valor basal de perfusión.

- Se ha desarrollado un dispositivo electrodo de mapeo eléctrico epicárdico para experimentación con modelos de corazón aislado y perfundido de conejo que permite fijar con rapidez la temperatura al valor deseado en la zona de contacto con el epicardio (en el margen de 22 °C a 42 °C) y estabilizarla durante el tiempo necesario.
- Se han aplicado protocolos específicos orientados a su validación funcional y caracterización. Durante la perfusión a temperatura basal (37 °C), estas modificaciones se realizan sin cambios significativos de temperatura en zonas distantes del epicardio.
- La penetración de los cambios térmicos en la pared ventricular es de alcance reducido, en especial en hipotermia.
- Los registros realizados con la aplicación de este electrodo han permitido analizar distintas variables electrofisiológicas así como mapas de activación epicárdica durante la FV gracias a la alta densidad de canales integrados en el mismo, obteniéndose resultados cuyas conclusiones se relacionan a continuación.

2. Con el dispositivo desarrollado, estudiar en el modelo experimental los efectos que causan las modificaciones locales de la temperatura sobre determinadas características electrofisiológicas del miocardio ventricular.

En particular se pretende cuantificar cómo afecta a: el intervalo QT, la inducibilidad de la FV mediante estimulación programada, la velocidad de conducción y la refractariedad durante la FV, y la complejidad de los patrones de activación de la FV.

Se detallan a continuación cada uno de ellos.

Intervalo QT

- Las modificaciones locales de temperatura alteran el intervalo QT respecto a la zona normotérmica, la hipotermia prolonga el intervalo y la hipertermia tiene el efecto opuesto, originando una dispersión en el QT miocárdico.
- Existe una correlación lineal entre el intervalo QT y la temperatura en la zona modificada.

Inducibilidad de la FV mediante estimulación programada

- La presencia de respuestas repetitivas es independiente de las modificaciones térmicas realizadas, éstas tampoco han favorecido la aparición de FV.
- La dispersión moderada del QT inducida por modificación térmica de carácter predominantemente epicárdico no se traduce en respuestas arritmogénicas.

Velocidad de conducción, longitud de onda, intervalo fibrilatorio y refractariedad en FV

- En la zona modificada la hipotermia produce un enlentecimiento de la conducción, mientras que la hipertermia tiene el efecto contrario.

- La hipotermia reduce la longitud de onda del proceso de activación miocárdica.
- Las modificaciones térmicas modulan el intervalo fibrilatorio, existiendo una correlación lineal entre ambos.
- Los cambios locales de temperatura modifican la refractariedad, estimada ésta a partir del Pct5 del intervalo fibrilatorio, existiendo una correlación lineal entre ambas.

Complejidad de los patrones de activación de la FV

- La hipotermia local incrementa la complejidad de los mapas de activación epicárdicos durante la FV.

3. Explorar procedimientos encaminados a revertir la FV mediante enfriamiento progresivo y selectivo del modelo experimental.

- El enfriamiento selectivo y gradual del epicardio no consigue la reversión de la FV.

Capítulo 8. **Bibliografía**

En este capítulo se enumeran las referencias bibliográficas utilizadas en la realización de la presente tesis doctoral. Se presentan ordenadas alfabéticamente con la misma referencia con que aparecen en los diferentes capítulos.

[**Abildskov 1994**] Abildskov JA. Additions to the wavelet hypothesis of cardiac fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1994 Jun; 5(6):553-9

[**Acierno 1994**] Acierno LJ. Historia de la Cardiología. Edika Med. Barcelona. 1994; 334-345

[**Akiyarna 1981**] Akiyarna T. Intracellular recording of in situ ventricular cells during ventricular fibrillation. *Am J Physiol*. 1981; 240(4): H465-71

[**Allessie et al. 1973**] Allessie MA, Bonke FIM, Schopman FJG. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. *Circ Res*. 1973; 33(1): 54-62

[**Allessie et al. 1976**] Allessie MA, Bonke FIM, Schopman FJG. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia (II). The role of non uniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block as studied with multiple microelectrodes. *Circ Res*. 1976; 39(2): 168-77

[**Allessie et al. 1977**] Allessie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia (III). The "leading circle" concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ Res*. 1977 Jul; 41(1):9-18

[**Allessie et al. 1985**] Allessie MA, Lammers WJEP, Bonke FIM, Hollen J. Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. In: Zipes DP, Jalife J eds. *Cardiac Arrhythmias*. New York: Grune and Stratton; 1985:265-76

[Antzelevitch et al. 1999] Antzelevitch C, Yan GX, Shimizu W, Burashnikov A. Electrical heterogeneity, the ECG, and cardiac arrhythmias. In: Cardiac electrophysiology: from cell to bedside (Zipes DP & Jalife J eds.), 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders. 1999. 222–38.

[Arnaud et al. 2002] Arnaud C, Joyeux M, Garrel C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Ribuot C. Free-radical production triggered by hyperthermia contributes to heat stress-induced cardioprotection in isolated rat hearts. *Br J Pharmacol* 2002;135(April (7)):1776–82.

[Aronow 2010a] Aronow WS. Implantable cardioverter-defibrillators. *Am J Ther.* 2010 Nov-Dec;17(6):e208-20. Review. PubMed PMID: 19918166.

[Aronow 2010b] Aronow WS. Management of ventricular arrhythmias. *Minerva Cardioangiol.* 2010 Dec;58(6):657-76. Review. PubMed PMID: 21135807.

[Aubert et al. 1994] Aubert AE, Denys BG, Ector H, De Geest H. Automatic detection of ventricular tachycardia and fibrillation using ECG processing and intramyocardial pressure measurement. *Comput Biomed Res.* 1994 Oct; 27(5):367-82

[Aupetit et al. 1993] Aupetit JF, Timour Q, Chevrel G, Loufoua-Moundanga J, Omar S, Faucon G. Attenuation of the ischaemia-induced fall of electrical ventricular fibrillation threshold by a calcium antagonist, diltiazem. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1993 Nov; 348(5):509-14

[Azarov et al. 2008] Azarov JE, Shmakov DN, Vityazev VA, Roshchevskaya IM, Artyeva NV, Kharin SN, et al. Ventricular repolarization pattern under heart cooling in the rabbit. *Acta Physiol (Oxf)* 2008;193(June (2)):129–38.

[Bardou et al. 1995] Bardou AL, Auger PM, Achour S, Dumeé P, Birkui PJ, Govaere MC. Effect of myocardial infarction and ischemia on induction of cardiac reentries and ventricular fibrillation. *Acta Biotheor.* 1995 Dec; 43(4):363-72

[Bayés et al. 1989] Bayés de Luna A, Coumel P, Leclercq JF. Ambulatory sudden cardiac death: mechanisms of production of fatal arrhythmia on the basis of data from 150 cases. *Am Heart J* 1989; 117(1): 151-9

[Bayly et al. 1993a] Bayly PV, Johnson EE, Idriss SF, Ideker RE, Smith WM. Efficient electrode spacing for examining spatial organization during ventricular fibrillation. *IEEE Trans Biomed Eng* 1993;40(October (10)):1060–6.

[Bayly et al. 1993b] Bayly PV, Johnson EE, Wolf PD, Greenside HS, Smith WM, Ideker RE. A quantitative measurement of spatial order in ventricular fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1993 Oct; 4(5):533-46

[Berenfeld and Jalife 1998] Berenfeld O, Jalife J. Purkinje-muscle reentry as a mechanism of polymorphic ventricular arrhythmias in a 3-dimensional model of the ventricles. *Circ Res.* 1998 Jun 1; 82(10):1063-77

[Berenfeld et al. 2003] Berenfeld O, Wellner M, Pertsov AM. Equilibration of scroll wave filaments in the ventricular wall and the minimal principle. *Int. J. Bifur. Chaos* 2003. 13 (12):3723–31

[Bjornstad et al. 1991] Bjornstad H, Tande PM, Refsum H. Cardiac electrophysiology during hypothermia. Implications for medical treatment. *Arctic Med Res.* 1991; 50 Suppl 6:71-5

[Bjornstad et al. 1994] Bjornstad H, Mortensen E, Sager G, and Refsum H. Effect of bretylium tosylate on ventricular fibrillation threshold during hypothermia in dogs. *Am J Emerg Med.* 1994 Jul; 12(4):407-12

[Bode et al. 2006] Bode F, Franz MR, Wilke I, Bonnemeier H, Schunkert H, Wiegand UK. Ventricular fibrillation induced by stretch pulse: implications for sudden death due to commotio cordis. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006;17(September (9)):1011–7.

[Boersma et al. 2002] Boersma L, Zetelaki Z, Brugada J, Allessie M. Polymorphic reentrant ventricular tachycardia in the isolated rabbit heart studied by high-density mapping. *Circulation* 2002;105(June (25)):3053–61.

[Bradley et al. 2011] Bradley CP, Clayton RH, Nash MP, Mourad A, Hayward M, Paterson DJ, Taggart P. Human ventricular fibrillation during global ischemia and reperfusion: paradoxical changes in activation rate and wavefront complexity. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2011 Oct;4(5):684-91.

[Brugada et al. 1990] Brugada J, Boersma L, Kirchhof C, Brugada P, Havenith M, Wellens HJ, Allessie M. Double wave reentry as a mechanism of acceleration of ventricular tachycardia. *Circulation.* 1990 May; 81(5):1633-43

[Cao et al. 1999] Cao JM, Qu Z, Kim YH, Wu TJ, Garfinkel A, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen PS. Spatiotemporal heterogeneity in the induction of ventricular fibrillation by rapid pacing: importance of cardiac restitution properties. *Circ Res.* 1999 Jun 11; 84(11):1318-31

[Capucci et al. 1995] Capucci A, Biffi M, Boriani G, Ravelli F, Nollo G, Sabbatani P, Orsi C, Magnani B. Dynamic electrophysiological behavior of human atria during paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation.* 1995 Sep 1;92(5):1193-202.

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

[Chen et al. 1988] Chen PS, Wolf PD, Dixon EG, Danieley ND, Frazier DW, Smith WM, Ideker RE. Mechanism of ventricular vulnerability to single premature stimuli in openchest dogs. *Circ Res.* 1988 Jun; 62(6):1191-209

[Chen et al. 1990] Chen PS, Wolf PD, Melnick SD, Danieley ND, Smith WM, Ideker RE. Comparison of activation during ventricular fibrillation and following unsuccessful defibrillation shocks in open-chest dogs. *Circ Res.* 1990 Jun; 66(6):1544-60

[Chen et al. 1998] Chen PS, Swerdlow CD, Hwang C, Karagueuzian HS. Current concepts of ventricular defibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1998 May; 9(5):553-62

- [Chen et al. 2003]** Chen PS, Wu TJ, Ting CT, Karagueuzian HS, Garfinkel A, Lin SF, Weiss JN. A tale of two fibrillations. *Circulation*. 2003 Nov 11; 108(19):2298-303
- [Choi et al. 2001]** Choi BR, Liu T, Salama G. The distribution of refractory periods influences the dynamics of ventricular fibrillation. *Circ Res*. 2001 Mar 16; 88(5):E49-58
- [Choi et al. 2002]** Choi BR, Nho W, Liu T, Salama G. Life span of ventricular fibrillation frequencies. *Circ Res*. 2002 Aug 23; 91(4):339-45
- [Choi et al. 2003]** Choi BR, Liu T, Lavasani M, Salama G. Fiber orientation and cell-cell coupling influence ventricular fibrillation dynamics. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003 Aug; 14(8):851-60
- [Chorro et al. 1990]** Chorro FJ, Kirchhof CJ, Brugada J, Allessie MA. Ventricular response during irregular atrial pacing and atrial fibrillation. *Am J Physiol*. 1990 Oct; 259(4):H1015-21
- [Chorro et al. 1996]** Chorro FJ, Sanchez-Munoz JJ, Sanchis J, Cortina J, Bataller M, Guerrero J, Espi J, Ruiperez JA, Lopez-Merino V. Modifications in the evolution of the dominant frequency in ventricular fibrillation induced by amiodarone, diltiazem, and flecainide. An experimental study. *J Electrocardiol*. 1996 Oct; 29(4):319-26
- [Chorro et al. 1998]** Chorro FJ, Egea S, Mainar L, Canoves J, Sanchis J, Llavador E, Lopez-Merino V, Such L. Modificaciones agudas de la longitud de onda del proceso de activación auricular inducidas por la dilatación. Estudio experimental. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51:874-83

[Chorro et al. 1998] Chorro FJ, Guerrero J, Cánoves J, Martínez-Sober M, Mainar L, Sanchis J, Calpe J, Llavador E, Espí J, López-Merino V. Quantification of the modifications in the dominant frequency of ventricular fibrillation under conditions of ischemia and reperfusion: an experimental study. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1998 Sep;21(9):1716-23. PubMed PMID: 9744433.

[Chorro et al. 1999] Chorro FJ, Egea S, Mainar L, Cánoves J, Llavador E, Sanchis J, Such L, Lopez- Merino V. Reduction of atrial fibrillation inducibility by radiofrequency ablation: An experimental study. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1999 Mar; 22(3):421-36

[Chorro et al. 2000a] Chorro FJ, Cánoves J, Guerrero J, Mainar L, Sanchis J, Such L, Lopez-Merino V. Alteration of ventricular fibrillation by flecainide, verapamil, and sotalol: an experimental study. *Circulation.* 2000 Apr 4; 101(13):1606-15.

[Chorro et al. 2000b] Chorro FJ, Cánoves J, Guerrero J, Mainar L, Sanchis J, Soria E, Such LM, Rosado A, Such L, Lopez-Merino V. Opposite effects of myocardial stretch and verapamil on the complexity of the ventricular fibrillatory pattern: an experimental study. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2000 Nov; 23(11):1594-603

[Chorro et al. 2002a] Chorro FJ, Guerrero J, Ferrero A, Tormos A, Mainar L, Millet J, Cánoves J, Porres JC, Sanchis J, Lopez-Merino V, Such L. Effects of acute reduction of temperature on ventricular fibrillation activation patterns. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Dec; 283(6):H2331-40.

[Chorro et al. 2002b] Chorro FJ, Millet J, Ferrero A, Cebrian A, Cánoves J, Martínez A, Mainar L, Porres JC, Sanchis J, López Merino V, Such L. Effects of myocardial stretching on excitation frequencies determined by spectral analysis during ventricular fibrillation. *Rev Esp Cardiol.* 2002 Nov; 55(11):1143-50

[Chorro et al. 2005] Chorro FJ, Trapero I, Guerrero J, Such LM, Cánoves J, Mainar L, et al. Modification of ventricular fibrillation activation patterns induced by local stretching. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005;16(October (10)):1087–96.

[Chorro et al. 2007] Chorro FJ, Blasco E, Trapero I, Cánoves J, Ferrero A, Mainar L, Such-Miquel L, Sanchis J, Bodí V, Cerdá JM, Alberola A, Such L. Selective myocardial isolation and ventricular fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2007 Mar;30(3):359-70. PubMed PMID: 17367355.

[Chorro et al. 2009a] Chorro FJ, Such-Belenguer L, López-Merino V. Modelos animales de enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(1):69-84

[Chorro et al. 2009b] Chorro FJ, Trapero I, Such-Miquel L, Pelechano F, Mainar L, Cánoves J, Tormos A, Alberola A, Hove-Madsen L, Cinca J, Such L. Pharmacological modifications of the stretch-induced effects on ventricular fibrillation in perfused rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Nov;297(5):H1860-9. Epub 2009 Sep 11. PubMed PMID: 19749168.

[Chorro et al. 2012] Chorro FJ, Pelechano F, Trapero I, Ibañez-Catalá X, Such-Miquel L, Tormos A, Guerrero J, Cánoves J, Mainar L, Millet J, Alberola A, Such L. Modifications in ventricular fibrillation and capture capacity induced by a linear radiofrequency lesion. *Rev Esp Cardiol.* 2012 Feb;65(2):143-51. Epub 2011 Dec 15. English, Spanish. PubMed PMID: 22177961.

[Chudin et al. 1999] Chudin, E., Goldhaber, J., Gar̄nkel, A., Weiss, J. & Kogan, B. 1999 Intracellular Ca²⁺ dynamics and the stability of ventricular tachycardia. *Biophys. J.* 77, 2930{2941.

[Ciaccio et al. 2005] Ciaccio EJ, Saltman AE, Hernandez OM, Bornholdt RJ, Coromilas J. Multichannel data acquisition system for mapping the electrical activity of the heart. *Pacing Clin Electrophysiol* 2005;28(August (8)):826–38.

[Coker 1989] Coker SJ. Anesthetized rabbit as a model for ischemia- and reperfusion-induced arrhythmias: effects of quinidine and bretylium. *J Pharmacol Methods.* 1989 Jul;21(4):263-79. PubMed PMID: 2755145.

[Copie et al. 1997] Copie X, Iliou MC, Lavergne T, Guize L, Le-Heuzey JY. Measurement of QT Interval. *Cardiac Electrophysiology Review* 1997;3:357–359

[Courtemanche et al. 1996] Courtemanche M, Keener J P, Glass L. A delay equation representation of pulse circulation on a ring of excitable media. *J Appl Math.* 1996. 56: 119-42

[Curtis 1994] Curtis MJ. Chemical defibrillation in acute myocardial ischaemia: a hypothesis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1994 Jan-Mar; 5(1):1-17

[Curtis 1998] Curtis MJ. Characterisation, utilisation and clinical relevance of isolated perfused heart models of ischaemia-induced ventricular fibrillation *Cardiovasc Res.* 1998 Jul; 39(1):194-215

[Dae et al. 2002] Dae MW, Gao DW, Sessler DI, Chair K, Stillson CA. Effect of endovascular cooling on myocardial temperature, infarct size, and cardiac output in humansized pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 May; 282(5):H1584-91

[Dalzell 1998] Dalzell GWN. Determinants of successful defibrillation. *Heart.* 1998 Oct; 80(4):405-7

[Davidenko et al. 1990] Davidenko JM, Kent PF, Chialvo DR, Michaels DC, Jalife J. Sustained vortexlike waves in normal isolated ventricular muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 Nov; 87(22):8785-9

[Davidenko et al. 1992] Davidenko JM, Pertsov AV, Salomonsz R, Baxter W, Jalife J. Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle. *Nature.* 1992 Jan 23; 355(6358):349-51

[Davis 1993] Davis RF. Etiology and treatment of perioperative cardiac arrhythmias, *Cardiac Anesthesia* 3rd edition. Edited by Kaplan JA, Philadelphia, WB Saunders. 1993, 170-205

[De Boer 1923] De Boer S. Die Physiologie und Pharmakologie des Flimmers. 1923; *Ergeb.Physiol* 1923; 21: 1

[Deo and Albert 2012] Deo R, Albert CM. Epidemiology and genetics of sudden cardiac death. *Circulation*. 2012 Jan 31;125(4):620-37.

[Dillon and Kwaku 1998] Dillon SM, Kwaku KF. Progressive depolarization: a unified hypothesis for defibrillation and fibrillation induction by shocks. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1998 May; 9(5):529-52

[Dillon et al. 1988] Dillon SM, Alessie MA, Ursell PC, Wit AL. Influences of anisotropic tissue structure on reentrant circuits in the epicardial border zone of subacute canine infarcts. *Circ Res*. 1988 Jul; 63(1):182-206

[Dorian and Newman 1997] Dorian P, Newman D. Tedisamil increases coherence during ventricular fibrillation, and decreases defibrillation energy requirements. *Cardiovasc Res*. 1997 Feb; 33(2):485-94

[Downar et al. 1988] Downar E, Harris L, Mickleborough LL, Shaikh N, Parson ID. Endocardial mapping of ventricular tachycardia in the intact human ventricle: evidence for reentrant mechanisms. *J Am Coll Cardiol*. 1988 Apr; 11(4):783-91

[Duytschaever et al. 2001] Duytschaever M, Mast F, Killian M, Blaauw Y, Wijffels M, Alessie M. Methods for determining the refractory period and excitable gap during persistent atrial fibrillation in the goat. *Circulation*. 2001 Aug 21;104(8):957-62. PubMed PMID: 11514386.

[Efimov et al. 1994] Efimov IR, Huang DT, Rendt JM, Salama G. Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts. *Circulation*. 1994 Sep; 90(3):1469-80

[Efimov et al. 2004] Efimov IR, Nikolski VP, Salama G. Optical imaging of the heart. *Circ Res.* 2004 Jul 9;95(1):21-33. Review.

[El-Sherif et al. 1982] El-Sherif N, Mehra R, Gough WB, Zeiler RH. Ventricular activation patterns of spontaneous and induced rhythms in canine 1-day-old myocardial infarction. Evidence for focal and reentrant mechanisms. *Circ Res.* 1982 Aug; 51(2):152-66

[Epstein et al. 1995] Epstein AE, Ideker RE. Ventricular fibrillation. In: *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside* (Zipes DP & Jalife J eds.), 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1995. 927-33.

[Erichsen 1842] Erichsen JE. On the influence of the coronary circulation on the action of the heart. *London Med.* 1842; 2: 561-562

[Erlanger 1912] Erlanger J. Observations on the physiology of Purkinje tissue. *Am J Physiol.* 30:395-419

[Eshel et al. 1990] Eshel G, Safar P, Sassano J, Stezoski W. Hyperthermia-induced cardiac arrest in dogs and monkeys. *Resuscitation.* 1990 Oct; 20(2):129-43

[Fenton et al. 2002] Fenton FH, Cherry EM, Hastings HM, Evans SJ. Multiple mechanisms of spiral wave breakup in a model of cardiac electrical activity. *Chaos.* 2002 Sep; 12(3):852-892

[Gambassi et al. 1994] Gambassi G, Cerbai E, Pahor M, Capogrossi MC, Carbonin P, and Mugelli A. Temperature modulates calcium homeostasis and ventricular arrhythmias in myocardial preparations. *Cardiovasc Res.* 1994 Mar; 28(3):391-9.

[Garfinkel et al. 2000] Garfinkel A, Kim YH, Voroshilovsky O, Qu Z, Kil JR, Lee MH, Karagueuzian HS, Weiss JN, Chen PS. Preventing ventricular fibrillation by flattening cardiac restitution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 May 23; 97(11):6061-6.

[Garrey 1914] Garrey WE. The nature of fibrillatory contractions of the heart: its relation to tissue mass and form. *Am J Physiol* 1914; 33: 397-414

[Girouard and Rosenbaum 1996] Girouard SD, Rosenbaum DS. Unique properties of cardiac action potentials recorded with voltage-sensitive dyes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1996 Nov; 7(11):1024-38

[Girouard et al. 1996] Girouard SD, Pastore JM, Laurita KR, Gregory KW, Rosenbaum DS. Optical mapping in a new guinea pig model of ventricular tachycardia reveals mechanisms for multiple wavelengths in a single reentrant circuit. *Circulation*. 1996 Feb 1; 93(3):603-13

[Goldenberg et al. 2006] Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W. QT Interval: How to Measure It and What Is “Normal”. *J Cardiovasc Electrophysiol*, Vol. 17, pp. 333-336, March 2006.

[Goldstein et al. 1994] Goldstein S, Bayés de Luna A, Guindo J: Sudden death, Mounth Kisko. Futura Publishing Co. Inc.; New York, 1994

[Gray et al. 1995a] Gray RA, Jalife J, Panfilov AV, Baxter WT, Cabo C, Davidenko JM, Pertsov AM. Mechanisms of cardiac fibrillation. *Science*. 1995 Nov 17; 270(5239):1222-3

[Gray et al. 1995b] Gray RA, Jalife J, Panfilov A, Baxter WT, Cabo C, Davidenko JM, Pertsov AM. Nonstationary vortexlike reentrant activity as a mechanism of polymorphic ventricular tachycardia in the isolated rabbit heart. *Circulation*. 1995 May 1; 91(9):2454-69

[Gray et al. 1998] Gray RA, Pertsov AM, Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. *Nature*. 1998 Mar 5;392(6671):75-8. Erratum in: *Nature* 1998 May 14;393(6681):191.

[Guevara et al. 1984] Guevara MR, Ward G, Shrier A, Glass L. Electrical alternans and period doubling bifurcations. *Proceedings of the IEEE Computers in Cardiology*. 1984; 562: 167–170

[Guillem et al. 2009] Guillem MS, Climent AM, Castells F, Husser D, Millet J, Arya A, Piorkowski C, Bollmann A. Noninvasive mapping of human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2009 May;20(5):507-13. Epub 2008 Nov 11. PubMed PMID: 19017334.

[Guyton 1956] Guyton AC. *Textbook of medical physiology*. Ed.: Philadelphia (Pa.): W. B. Saunders, 1956. ISBN/ISSN: 0721643949 9780721643946

[Guyton and Hall 2007] Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica*. 11ª ed. Madrid. McGraw-Hill/Interamericana de España. 2007. ISBN 9788481749267

[Haissaguerre et al. 2002] Haissaguerre M, Shoda M, Jais P, Nogami A, Shah DC, Kautzner J, Arentz T, Kalushe D, Lamaison D, Griffith M, Cruz F, de Paola A, Gaita F, Hocini M, Garrigue S, Macle L, Weerasooriya R, Clementy J. Mapping and ablation of idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation*. 2002 Aug 20; 106(8):962-7

[Hale and Kloner 1999] Hale SL, Kloner RA: Myocardial hypothermia: A potential therapeutic technique for acute regional myocardial ischemia. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999 Mar; 10(3):405-13

[Han and Moe 1964] Han J, Moe GK. Nonuniform recovery of excitability in ventricular muscle. *Circ Res*. 1964 Jan;14:44-60.

[Hao et al. 2004] Hao SC, Christini DJ, Stein KM, Jordan PN, Iwai S, Bramwell O, Markowitz SM, Mittal S, Lerman BB. Effect of beta-adrenergic blockade on dynamic electrical restitution in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Jul; 287(1):H390-4

[Harada et al. 2008] Harada M, Honjo H, Yamazaki M, Nakagawa H, Ishiguro YS, Okuno Y, Ashihara T, Sakuma I, Kamiya K, Kodama I. Moderate hypothermia increases the chance of spiral wave collision in favor of self-termination of ventricular tachycardia/fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Apr;294(4):H1896-905.

[Harrison and Bers 1989] Harrison SM, Bers DM. Influence of temperature on the calcium sensitivity of the myofilaments of skinned ventricular muscle from the rabbit. *J Gen Physiol*. 1989 Mar;93(3):411-28. PubMed PMID: 2703821; PubMed Central PMCID: PMC2216215.

[Herve et al. 1992] Herve JC, Yamaoka K, Twist VW, Powell T, Ellory JC, Wang LC. Temperature dependence of electrophysiological properties of guinea pig and ground squirrel myocytes. *Am J Physiol.* 1992 Jul; 263(1):R177-84

[Higashidate et al. 1987] Higashidate M, Takanashi Y, Fujiwara T, and Imai Y. A new method to induce topical cooling of the right atrium for treatment of supraventricular tachyarrhythmia: an experimental study. *Ann Thorac Surg.* 1987 Mar; 43(3):313-7

[Hillsley et al. 1995] Hillsley RE, Bollacker KD, Simpson EV, Rollins DL, Yarger MD, Wolf PD, Smith WM, Ideker RE. Alteration of ventricular fibrillation by propranolol and isoproterenol detected by epicardial mapping with 506 electrodes. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1995 Jun; 6(6):471-85

[Hoffman 1912] Hoffman A. Fibrillation of ventricles and the end of an attack of paroxysmal tachycardia in man. *Heart* 1912; 3: 213-8

[Hoffman and Cranefield 1976] Hoffman BF, Cranefield PF. *Electrophysiology of the Heart.* Mount Kisco, NY:Futura, 1976, 95–8

[Hogancamp et al. 1959] Hogancamp CE, Kardesch M, Danforth VM. Transmembrane electrical potentials in ventricular tachycardia and fibrillation. *Am Heart J* 1959; 57:214-222

[Hooks and Trew 2008] Hooks DA, Trew ML. Construction and validation of a plunge electrode array for three-dimensional determination of conductivity in the heart. *IEEE Trans Biomed Eng* 2008;55(February (2 Pt 1)):626–35.

[Hsieh et al. 2009a] Hsieh YC, Horng TL, Lin SF, Lin TC, Ting CT, Wu TJ. d,l-Sotalol at therapeutic concentrations facilitates the occurrence of long-lasting non-stationary reentry during ventricular fibrillation in isolated rabbit hearts. *Circ J* 2009;73(January (1)):39–47.

[Hsieh et al. 2009b] Hsieh YC, Lin SF, Lin TC, Ting CT, Wu TJ. Therapeutic hypothermia (30 degrees C) enhances arrhythmogenic substrates, including spatially discordant alternans, and facilitates pacing-induced ventricular fibrillation in isolated rabbit hearts. *Circ J*. 2009 Dec;73(12):2214-22.

[Huang et al. 1998] Huang J, Rogers JM, Kenknight BH, Rollins DL, Smith WM, Ideker RE. Evolution of the organization of epicardial activation patterns during ventricular fibrillation. *Cardiovasc Electrophysiol*. 1998 Dec; 9(12):1291-1304

[Hunter et al. 1997] Hunter PJ, Smail BH, Nielson PMF, LeGrice IJ. A mathematical model of cardiac anatomy. In: *Computational biology of the heart* (ed. Panfilov AV & Holden AV). Wiley 1997. 171-215

[Ibáñez-Català et al. 2009] X. Ibáñez-Català, M. Guillem, A. Climent, F. J. Chorro, F. Pelechano, I. Traperó, E. Roses, A. Guill, A. Tormos, and J. Millet. 2D Isochronal correlation method to detect pacing capture during ventricular fibrillation. 4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering, 22 ed. Springer Berlin Heidelberg, Ed. Belgium: Springer, 2009, pp. 14-17

[Ideker et al. 1981] Ideker RE, Klein GJ, Harrison L, Smith WM, Kasell J, Reimer KA, Wallace AG, Gallagher JJ. The transition to ventricular fibrillation induced by reperfusion after acute ischemia in the dog: a period of organized epicardial activation. *Circulation*. 1981 Jun; 63(6):1371-9

[Jais et al. 1997] Jais P, Haissaguerre M, Shah DC, Chouairi S, Gencel L, Hocini M, Clementy J. A focal source of atrial fibrillation treated by discrete radiofrequency ablation. *Circulation*. 1997 Feb 4;95(3):572-6

[Jalife 2000] Jalife J. Ventricular fibrillation: mechanisms of initiation and maintenance. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62: 25–50.

[Jalife 2011] Jalife J. Déjà vu in the theories of atrial fibrillation dynamics. *Cardiovasc Res*. 2011 Mar 1;89(4):766-75.

[Jalife and Berenfeld 2004] Jalife J, Berenfeld O. Molecular mechanisms and global dynamics of fibrillation: an integrative approach to the underlying basis of vortex-like reentry. *J Theor Biol*. 2004 Oct 21; 230(4):475-87

[Jalife and Gray 1996] Jalife J, Gray R. Drifting vortices of electrical waves underlie ventricular fibrillation in the rabbit heart. *Acta Physiol Scand*. 1996 Jun;157(2):123-31. PubMed PMID: 8800352. Exemple de estudi de Jalife de FV en cor de conill

[Jalife et al. 1998a] Jalife J, Gray RA, Morley GE, Davidenko JM. Self organization and the dynamical nature of ventricular fibrillation. *Chaos*. 1998 Mar; 8(1):79-93

[Jalife et al. 1998b] Jalife J, Berenfeld O, Skanes A, Mandapati R. Mechanisms of atrial fibrillation: mother rotors or multiple daughter wavelets, or both? *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1998 Aug; 9(8 Suppl):S2-12

[Janse 1998] Janse MJ. Vulnerability to ventricular Fibrillation. *Chaos.* 1998 Mar; 8(1):149-156

[Janse et al. 1995] Janse MJ, Wilms FJG, Coronel R. Ventricular fibrillation is not always due to multiple wavelet reentry. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1995 Jul; 6(7):512-21

[Janse et al. 1998] Janse MJ, Opthof T, Kléber AG. Animal models of cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 1998 Jul;39(1):165-77. Review. PubMed PMID: 9764198

[Jetova and Krasteva 2004] Jekova I, Krasteva V. Real time detection of ventricular fibrillation and tachycardia. *Physiol Meas.* 2004 Oct; 25(5):1167-78.

[Jetova and Mitev 2002] Jekova I, Mitev P. Detection of ventricular fibrillation and tachycardia from the surface ECG by a set of parameters acquired from four methods. *Physiol Meas.* 2002 Nov; 23(4):629-34

[Josephson 2001] Josephson ME. *Clinical Cardiac Electrophysiology: Techniques and Interpretations.* Ed: Lippincott Williams and Wilkins; 3rd Revised edition. ISBN-10: 0683306936

[Kaup et al. 2004] Kaup HJ, Hexamer M, Werner J. Morphological detection algorithms for the automatic implantable cardioverter/defibrillator (AICD). *Biomed Tech (Berl).* 2004 Nov;49(11):306-10. PubMed PMID: 15624867.

[Kenknight et al. 1995] KenKnight BH, Bayly PV, Gerstle RJ, Rollins DL, Wolf PD, Smith WM, Ideker RE. Regional capture of fibrillating ventricular myocardium. *Circ Res.* 1995 Oct; 77(4):849-55

[Kern 1998] Kern KB. Public access defibrillation: a review. *Heart* 1998; 80:402-4
Kim et al. 1997 Kim YH, Garfinkel A, Ikeda T, Wu TJ, Athill CA, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen PS. Spatiotemporal complexity of ventricular fibrillation revealed by tissue mass reduction in isolated swine right ventricle. Further evidence for the quasiperiodic route to chaos hypothesis. *J Clin Invest.* 1997 Nov 15; 100(10):2486-500

[Kim et al. 1997] Kim YH, Garfinkel A, Ikeda T, Wu TJ, Athill CA, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen PS. Spatiotemporal complexity of ventricular fibrillation revealed by tissue mass reduction in isolated swine right ventricle. Further evidence for the quasiperiodic route to chaos hypothesis. *J Clin Invest.* 1997 Nov 15; 100(10):2486-500

[Kirchhof et al. 1993] Kirchhof C, Chorro F, Scheffer GJ, Brugada J, Konings K, Zetelaki Z, Allessie M. Regional entrainment of atrial fibrillation studied by high-resolution mapping in open-chest dogs. *Circulation.* 1993 Aug; 88(2):736-49

[Kiyosue et al. 1993] Kiyosue T, Arita M, Muramatsu H, Spindler AJ, and Noble D. Ionic mechanisms of action potential prolongation at low temperature in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* 1993 Aug; 468:85-106

[Koller et al. 1998] Koller ML, Riccio ML, Gilmour RF Jr. Dynamic restitution of action potential duration during electrical alternans and ventricular fibrillation. *Am J Physiol.* 1998 Nov; 275(5):H1635-42

[Konings et al. 1994] Konings KT, Kirchhof CJ, Smeets JR, Wellens HJ, Penn OC, Allessie MA. Highdensity mapping of electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation*. 1994 Apr; 89(4):1665-80

[Kramer and Zimetbaum 2011] Kramer DB, Zimetbaum PJ. Long-QT syndrome. *Cardiol Rev*. 2011 Sep-Oct;19(5):217-25.

[Kubota et al. 1988] Kubota I, Lux RL, Burgess MJ, Abildskov JA. Activation sequence at the onset of arrhythmias induced by localized myocardial warming and programmed premature stimulation in dogs. *J Electrocardiol*. 1988 Nov; 21(4):345-54

[Kuo et al. 1983] Kuo CS, Munakata K, Reddy P, Surawicz B. Characteristics and possible mechanisms of ventricular arrhythmias dependent on the dispersion of action potential durations. *Circulation*. 1983 Jun; 67(6):1356-67

[Kwan et al. 1998] Kwan YY, Fan W, Hough D, Lee JJ, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen PS. Effects of procainamide on wave-front dynamics during ventricular fibrillation in open-chest dogs. *Circulation*. 1998 May 12;97(18):1828-36

[Langendorff 1895] Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch*. 1895. 61:291–332

[Langendorff 1903] Langendorff, O. Geschichtliche Betrachtungen zur Methode des überlebenden Warmblüterherzens. *Muench. Med. Wochenschr* 1903. 50:508–9

[Larsen et al. 2002] Larsen G, Hallstrom A, McAnulty J, Pinski S, Olarte A, Sullivan S, Brodsky M, Powell J, Marchant C, Jennings C, Akiyama T. Cost-effectiveness of the implantable cardioverter-defibrillator versus antiarrhythmic drugs in survivors of serious ventricular tachyarrhythmias: results of the Antiarrhythmics Versus Implantable Defibrillators (AVID) economic analysis substudy. *Circulation* 2002;105:2049-2057.

[Lee et al. 1996] Lee JJ, Kamjoo K, Hough D, Hwang C, Fan W, Fishbein MC, Bonometti C, Ikeda T, Karagueuzian HS, Chen PS. Reentrant wave fronts in Wiggers' stage II ventricular fibrillation: Characteristics, and mechanisms of termination and spontaneous regeneration. *Circ Res.* 1996 Apr; 78(4):660-75

[Levy and Lewis 1911] Levy AG, Lewis T. Heart irregularities, resulting from the inhalation of low percentages of chloroform vapour, and their relationship to ventricular fibrillation. *Heart* 1911; 3:99-112

[Lewis 1915] Lewis T. *Lectures on the Heart*. New York: Hoeber. 1915

[Li et al. 2011] Li YP, Qin J, Fan ZX, Jiang L, Chen WQ, Hu CL, Zhao Y. [The effects of mild hypothermia on cardiac function and myocardial structure in a rabbits model of ventricular fibrillation after restoration of spontaneous circulation]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2011 Dec;23(12):743-8. Chinese. PubMed PMID: 22153013.

[Liu et al. 1991] Liu B, Arlock P, Wohlfart B, Johansson BW. Temperature effects on the Na and Ca currents in rat and hedgehog ventricular muscle. *Cryobiology.* 1991 Feb; 28(1):96-104

[Liu et al. 2004] Liu YB, Pak HN, Lamp ST, Okuyama Y, Hayashi H, Wu TJ, Weiss JN, Chen PS, Lin SF. Coexistence of two types of ventricular fibrillation during acute regional ischemia in rabbit ventricle. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2004 Dec; 15(12):1433-40

[Livshitz et al. 2005] Livshitz L, Decker K, Faber G, O'hara T, Silva J, Rudy Y, Ten Tusscher KH, Noble D, Noble PJ, Panfilov AV. Comments on "A model for human ventricular tissue". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Jan; 288(1):H453

[Lou et al. 2011] Lou Q, Li W, Efimov IR. Multiparametric optical mapping of the Langendorff-perfused rabbit heart. *J Vis Exp.* 2011 Sep 13;(55). pii: 3160.

[Luo and Rudy 1994] Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation. *Circ Res.* 1994 Jun; 74(6):1097-113

[Malkin et al. 2000] Malkin RA, Pendley BD. Construction of a very high-density extracellular electrode array. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(July (1)):H437-42.

[Malmivuo and Plonsey 1995] Malmivuo J, Plonsey R. *Bioelectromagnetism. Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields.* Oxford University Press 1995. <http://www.bem.fi/book/index.htm>

[Martín-Huerta et al. 1994] Martín-Huerta E, Moro Serrano C, Novo L, Madrid AH, Lage J, Mestre IL. Implante pectoral de desfibrilador automático por cardiólogos en un laboratorio de electrofisiología. *Rev Esp Cardiol* 1994; 47:706-709

[Mastrototaro et al. 1992] Mastrototaro JJ, Massoud HZ, Pilkington TC, Ideker RE. Rigid and flexible thinfilm multielectrode arrays for transmural cardiac recording. *IEEE Trans Biomed Eng* 1992;39(March (3)):271-9.

[McWilliam 1887] McWilliam JA. Fibrillar contraction of the heart. *J Physiol* 1887; 8:296

[McWilliam 1889] McWilliam JA. Electrical stimulation of the heart in man. *Br Med J*. 1889; 1:348

[Meyer et al. 2004] Meyer T, Boven KH, Günther E, Fejtl M. Micro-electrode arrays in cardiac safety pharmacology: a novel tool to study QT interval prolongation. *Drug Saf*. 2004;27(11):763-72.

[Miki et al. 1998] Miki T, Liu G, Cohen M, and Downey J. Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart. A practical intervention for acute myocardial infarction? *Basic Res Cardiol*. 1998 Oct; 93(5):372-83

[Milberg et al. 2005] Milberg P, Reinsch N, Osada N, Wasmer K, Monnig G, Stypmann J, et al. Verapamil prevents torsade de pointes by reduction of transmural dispersion of repolarization and suppression of early after depolarizations in an intact heart model of LQT3. *Basic Res Cardiol* 2005;100(July (4)):365-71.

[**Millet 1997**] Millet J. Estudio de las técnicas para el diagnóstico e identificación de fibrilación ventricular y otras arritmias malignas en el ámbito de los desfibriladores automáticos externos e implantables. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València. 1997.

[**Mines 1913**] Mines GR. On dynamic equilibrium in the heart. *J Physiol* 1913; 46:349-83

[**Mines 1914**] Mines GR. On circulating excitation in heart muscles and their possible relation to tachycardia and fibrillation. *Trans R Soc Can (Section IV)*. 1914; 43-52

[**Moe 1956**] Moe GK. Introductory remarks to part III of experimental methods for the evaluation of drugs in various disease states. *Ann NY Acad Sci*. 1956; 64: 540-2

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

[**Moe and Abildskov 1959**] Moe GK, Abildskov JA. Atrial Fibrillation as a self-sustained arrhythmia independent of focal discharge. *Am Heart J*. 1959. 58:59-70

[**Moe et al. 1941**] Moe GK, Harris S, Wiggers CJ. Analysis of the initiation of fibrillation by electrocardiographic studies. *Am J Physiol*. 1941; 134: 473-87

[**Moe et al. 1964**] Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J*. 1964; 67: 200-20

[Mortensen et al. 1993] Mortensen E, Berntsen R, Tveita T, Lathrop DA, and Refsum H. Changes in ventricular fibrillation threshold during acute hypothermia. A model for future studies. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1993 Oct-Dec; 4(4):313-9

[Mouritzen and Andersen 1966] Mouritzen CV and Andersen MN. Mechanisms of ventricular fibrillation during hypothermia. Relative changes in myocardial refractory period and conduction velocity. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1966 Apr; 51(4):579-84

[Nash et al. 2006] Nash MP, Mourad A, Clayton RH, Sutton PM, Bradley CP, Hayward M, Paterson DJ, Taggart P. Evidence for multiple mechanisms in human ventricular fibrillation. *Circulation.* 2006 Aug 8;114(6):536-42. Epub 2006 Jul 31. PubMed PMID: 16880326.

[Nishida et al. 2004] Nishida K, Fujiki A, Mizumaki K, Sakabe M, Sugao M, Tsuneda T, et al. Canine model of Brugada syndrome using regional epicardial cooling of the right ventricular outflow tract. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004;15(August (8)):936–41.

[Nolasco and Dahlen 1968] Nolasco J, Dahlen R. A graphic method for the study of alternation in cardiac action potentials. *J Appl Physiol.* 1968. 25:191-6

[Nygards and Hulting 1977] Nygards, ME, Hulting J. Recognition of ventricular fibrillation from the power spectrum of the ECG. *Proceedings of the IEEE Computers in Cardiology.* 1977; 393-7

[Nygren et al. 2003] Nygren A, Kondo C, Clark RB, Giles WR. Voltage-sensitive dye mapping in Langendorff-perfused rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Mar;284(3):H892-902

[Pak et al. 2003] Pak HN, Oh YS, Liu YB, Wu TJ, Karagueuzian HS, Lin SF, Chen PS. Catheter ablation of ventricular fibrillation in rabbit ventricles treated with beta-blockers. *Circulation*. 2003 Dec 23; 108(25):3149-56.

[Panfilov 1999a] Panfilov AV. Three-dimensional organization of electrical turbulence in the heart. *Phys Rev*. 1999. E59:R6251-4

[Panfilov 1999b] Panfilov, A. V. Three-dimensional wave propagation in mathematical models of ventricular fibrillation. In: *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside* (Zipes DP & Jalife J eds.), 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1999. 271-7

[Panfilov and Hogeweg 1995] Panfilov AV, Hogeweg P. Mechanisms of cardiac Fibrillation. *Science*. 1995 Nov 17; 270(5239):1223-4

[Panfilov and Hogeweg 1996] Panfilov AV, Hogeweg P. Scroll breakup in a three-dimensional excitable medium *Phys Rev*. 1996 Feb; 53(2):1740-3

[Panfilov and Holden 1990] Panfilov AV, Holden AV. Self-generation of turbulent vortices in a twodimensional model of cardiac tissue. *Phys Lett*. 1990. A147:463-6

[Panfilov and Pertsov 2001] Panfilow A, Pertsov A. Ventricular fibrillation: evolution of the multiple-wavelet hypothesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* (2001) 359, 1315-1325

[Patel et al. 2010] Patel C, Yan GX, Antzelevitch C. Short QT syndrome: from bench to bedside. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2010 Aug;3(4):401-8. Review. PubMed PMID: 20716721; PubMed Central PMCID: PMC2933105.

[Pelechano 2008] 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. Universitat de València, Tesi doctoral, juliol 2008. Servei de Publicacions UV, ISBN: 9788437072944 . <http://hdl.handle.net/10803/9916>

[Pfammatter et al. 1995] Pfammatter JP, Paul T, Ziemer G, and Kallfelz HC. Successful management of junctional tachycardia by hypothermia after cardiac operations in infants. *Ann Thorac Surg.* 1995 Sep; 60(3):556-60.

[Pogwizd and Corr 1987] Pogwizd SM, Corr PB. Electrophysiologic mechanisms underlying arrhythmias due to reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation.* 1987 Aug; 76(2):404-26

[Qu et al. 1999] Qu Z, Weiss JN, Garfinkel A. Cardiac electrical restitution properties and stability of reentrant spiral waves: a simulation study. *Am J Physiol.* 1999 Jan; 276(1):H269-83

[Ravelli and Allessie 1997] Ravelli F, Allessie M. Effects of atrial dilatation on refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in the isolated Langendorff-perfused rabbit heart. *Circulation.* 1997 Sep 2;96(5):1686-95. PubMed PMID: 9315565.

[Reppel et al. 2004] Reppel M, Pillekamp F, Lu ZJ, Halbach M, Brockmeier K, Fleischmann BK, Hescheler J. Microelectrode arrays: a new tool to measure embryonic heart activity. *J Electrocardiol.* 2004;37 Suppl:104-9.

[Riascos et al. 2004] Riascos D, Baltaxe E, Pascual A. La preparación Langendorff: corazón de mamífero aislado y perfundido. *Universitas Médica.* 2004; 45(3):111-117

[Riccio et al. 1999] Riccio ML, Koller ML, Gilmour RF. Electrical restitution and spatiotemporal organization during ventricular fibrillation. *Circ Res.* 1999 Apr 30;84(8):955-63

[Rogers et al. 1999] Rogers JM, Huang J, Smith WM, Ideker RE. Incidence, evolution, and spatial distribution of functional reentry during ventricular fibrillation in pigs. *Circ Res.* 1999 Apr 30; 84(8):945-54

[Rogers et al. 2002] Rogers JM, Melnick SB, Huang J. Fiberglass needle electrodes for transmural cardiac mapping. *IEEE Trans Biomed Eng* 2002;49(December (12 Pt 2)):1639-41.

[Rogers et al. 2003] Rogers JM, Huang J, Melnick SB, Ideker RE. Sustained reentry in the left ventricle of fibrillating pig hearts. *Circ Res.* 2003 Mar 21; 92(5):539-45

[Romero et al. 2010] Romero L, Carbonell B, Trenor B, Rodriguez B, Saiz J, Ferrero JM. Human and rabbit inter-species comparison of ionic mechanisms of arrhythmic risk: A simulation study. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2010;2010:3253-6. PubMed PMID:21096607.

[Rosenbaum and Jalife 2001] Optical mapping of cardiac excitation and arrhythmias. Rosenbaum DS & Jalife J eds. Armonk, New York. Editorial Futura Publishing Co. Inc. 2001

[Roy et al. 2009] Roy S, Chen MQ, Kovacs GT, Giovannardi L. Conduction analysis in mixed cardiomyocytes-fibroblasts cultures using microelectrode arrays. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009;2009:4250-3.

[Sahakian et al. 2001] Sahakian AV, Peterson MS, Shkurovich S, Hamer M, Votapka T, Ji T, et al. Asynchronous multichannel monophasic action potential electrode array for in vivo epicardial repolarization mapping. IEEE Trans Biomed Eng 2001;48(March (3)):345-53.

[Salama et al. 1998] Salama G, Kanai AJ, Huang D, Efimov IR, Girouard SD, Rosenbaum DS. Hypoxia and hypothermia enhance spatial heterogeneities of repolarization in guinea pig hearts: analysis of spatial autocorrelation of optically recorded action potential durations. J Cardiovasc Electrophysiol. 1998 Feb; 9(2):164-83

[Samie et al. 2001] Samie FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J, Taffet S, Pertsov AM, Jalife J. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. Circ Res. 2001 Dec 7; 89(12):1216-23

[Sano et al. 1958] Sano T, Tsuchihashi R, Shimamoto T. Ventricular fibrillation studied by the microelectrode method. Circ Res. 1958 Jan; 6(1):41-6

[Schalij et al. 1992] Schalij MJ; Lammers WJE, Rensma PL, Allessie MA. Anisotropic conduction and reentry in perfused epicardium of rabbit left ventricle. *Am J Physiol.* 1992 Nov; 263(5):H1466-78

[Scherf and Schott 1953] Scherf D, Schott A. Extrasystoles and Allied Arrhythmias. New York: Grune & Stratton. 1953; 342-55

[Schwartz et al. 2001] Schwartz DS, Bremner RM, Baker CJ, Uppal KM, Barr ML, Cohen RG, Starnes VA. Regional topical hypothermia of the beating heart: preservation of function and tissue. *Ann Thorac Surg.* 2001 Sep; 72(3):804-9

[Shenasa et al. 1996] Shenasa M, Borggreffe M, Breithardt G, Haverkamp W, Hindricks G Cardiac mapping. New York: Futura Publishing Co. Inc. 1996

[Shkurocich et al. 2000] Shkurovich S, Sahakian AV, Votapka TV, Ji T, Swiryn S. Multi-site dual surface monophasic action potential mapping of atrial repolarization in vivo: is atrial repolarization a two- or three-dimensional process? *J Electrocardiol* 2000;33(Suppl.):127-31.

[Shutt and Howlett 2008] Shutt RH, Howlett SE. Hypothermia increases the gain of excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Sep;295(3):C692-700. Epub 2008 Jul 9. PubMed PMID: 18614812.

[Simmers et al. 1995] Simmers TA, De Bakker JM, Wittkampf FH, Hauer RN. Effects of heating on impulse propagation in superfused canine myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 1995 May;25(6):1457-64

[Skrzypiec-Spring et al. 2007] 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* 2007;55(March (2)):113–26.

[Smeets et al. 1986] Smeets JLRM, Allessie MA, Lammers JEP, Bonke FIM, Hollen J. The wavelength of the cardiac impulse and reentrant arrhythmias in isolated rabbit atrium: the role of heart rate, autonomic transmitters, temperature, and potassium. *Circ Res.* 1986 Jan; 58(1):96–108

[Spear and Moore 1998] Spear JF, Moore EN. Modulation of quinidine-induced arrhythmias by temperature in perfused rabbit heart. *Am J Physiol* 1998;274(March (3 Pt 2)):H817–28.

[Sprung et al. 1995] Sprung J, Laszlo A, Turner LA, Kampine JP, and Bosnjak ZJ. Effects of hypothermia, potassium and verapamil on the action potential characteristics of canine cardiac Purkinje fibers. *Anesthesiology.* 1995 Mar; 82(3):713–22

[Stephenson 2004] Stephenson E. Ventricular Fibrillation. *eMedicine Journal* serial online . 2004. Available at: <http://www.emedicine.com/ped/topic2398.htm>. Accessed Dec. 7, 2004

[Strohmenger et al. 1997] Strohmenger HU, Lindner KH, Brown CG. Analysis of the ventricular fibrillation ECG signal amplitude and frequency parameters as predictors of countershock success in humans. *Chest.* 1997 Mar; 111(3): 584-589

[Such et al. 2008] 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)*. 2008 Aug;193(4):331-9. Epub 2008 Mar 13. PubMed PMID: 18346209.

[Swartz et al. 1993] Swartz JF, Jones JL, Fletcher RD. Characterization of ventricular fibrillation based on monophasic action potential morphology in the human heart. *Circulation*. 1993 Jun; 87(6):1907-14

[Swissa et al. 2002] Swissa M, Qu Z, Ohara T, Lee MH, Lin SF, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Weiss JN, Chen PS. Action potential duration restitution and ventricular fibrillation due to rapid focal excitation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 May; 282(5):H1915-23

[Tachibana et al. 1999] Tachibana H, Kubota I, Yamaki M, Watanabe T, Tomoike H. Canine model of ventricular fibrillation using programmed stimuli and localized myocardial warming or cooling. *Jpn Heart J* 1999;40(March (2)):179-88.

[Thakor et al. 1990] Thakor NV, Zhu YS, Pan KY. Ventricular tachycardia and fibrillation detection by a sequential hypothesis testing algorithm. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1990 Sep; 37(9):837-43

[Tormos 2005] Tormos A, Estudio experimental de los efectos de la hipotermia y la hipertermia locales sobre los parámetros electrofisiológicos del miocardio y la frecuencia de activación de la fibrilación ventricular. Universitat Politècnica de València, Tesis doctoral, Julio 2005. <http://hdl.handle.net/10251/1824>

[Tormos et al. 2003] Tormos A, Millet J, Such L, Chorro FJ. Effects of Local Temperature Variation on Ventricular Fibrillation Dominant Frequency. *Computers in Cardiology* 2003;30:497-500.

[Tormos et al. 2004] Tormos A, Millet J, Chorro FJ, Such L. Modifications in the Activation Process during Ventricular Fibrillation by Local Hyperthermia. *Computers in Cardiology* 2004;31:25–28.

[Tormos et al. 2005] Tormos A, Millet J, Chorro FJ, Such L, Canoves J, Mainar L, Blasco E, Trapero I. Changes in Ventricular Refractoriness and Conduction Velocity Induced by Local Hypothermia and Hyperthermia. *Computers in Cardiology* 2005

[Tormos et al. 2008] Tormos A, Chorro FJ, Millet J, Such L, Canoves J, Mainar L, et al. Analyzing the electrophysiological effects of local epicardial temperature in experimental studies with isolated hearts. *Physiol Meas* 2008;29(July (7)):711–28.

[Tovar and Jones 1997] Tovar OH, Jones JL. Epinephrine facilitates cardiac fibrillation by shortening action potential refractoriness. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 May; 29(5):1447-55.

[Towne et al. 1972] Towne ED, Geiss WP, Yanes HO, Rahimtoola SH. Intractable ventricular fibrillation associated with profound hypothermia. Successful treatment with partial cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med.* 1972 Nov 30; 287(22):1135-6

[**Trapero 2006**] Trapero I, Modificaciones del patrón fibrilatorio ventricular por el estiramiento regional del ventrículo izquierdo: estudio en corazón aislado de conejo. Universitat de València, Tesis doctoral, octubre 2006. Servei de Publicacions UV, ISBN: 9788437066424. <http://hdl.handle.net/10803/9904>

[**Trapero et al. 2008**] Trapero I, Chorro FJ, Such-Miquel L, Cánoves J, Tormos A, Pelechano F, López L, Such L. [Effect of streptomycin on stretch-induced change in myocardial activation during ventricular fibrillation]. *Rev Esp Cardiol.* 2008 Feb;61(2):201-5. Spanish. PubMed PMID: 18364190.

[**Tusscher et al. 2004**] Tusscher KH, Noble D, Noble PJ, Panfilov AV. A model for human ventricular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Apr; 286(4):H1573-89

[**Ujhelyi et al. 2001**] Ujhelyi MR, Sims JJ, Dubin SA, Vender J, and Miller AW. Defibrillation energy requirements and electrical heterogeneity during total body hypothermia. *Crit Care Med.* 2001 May; 29(5):1006–11

[**Valderrabano et al. 2002**] Valderrabano M, Yang J, Omichi C, Kil J, Lamp ST, Qu Z, Lin SF, Karagueuzian HS, Garfinkel A, Chen PS, Weiss JN. Frequency analysis of ventricular fibrillation in Swine ventricles. *Circ Res.* 2002 Feb 8; 90(2):213-22

[**Vulpian 1874**] Vulpian A. Notes sur les effets de la faradisation directe des ventricules du coeur chez le chien. *Arch Physiol Norm Path.* 1874; 6:975

[Waldo 1998] Waldo AL. Low-energy atrial defibrillation: a promising new technique. *Circulation*. 1998 Sep 1; 98(9):833-4

[Warren et al. 1996] Warren JA, Dreher RD, Jaworski RV, Putzke JJ, Russie RJ. Implantable Cardioverter Defibrillators. *Proceedings of the IEEE Computers in Cardiology*. 1996 Mar; 84(3): 468-79

[Weaver et al. 1985] Weaver VY, Cobb LA, Dennis D, Roberta R, Alfred HP, Copass CK. Amplitude of ventricular fibrillation waveform and outcome after cardiac arrest. *Ann Intern Med*. 1985 Jan; 102(1): 53-5

[Webster 1992] Webster JG (ed.). *Medical instrumentation. Application and design*. Boston: Houghton Mifflin Company, 1992

[Weiner and Rosenblueth 1946] Weiner N, Rosenblueth A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch Inst Cardiol Mex*. 1946; 16:205-65

[Weiss et al. 1999] Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Qu Z, Chen PS. Chaos and the transition to ventricular fibrillation. A new approach to antiarrhythmic drug evaluation. *Circulation*. 1999 Jun; 99(21):2819-26

[Weiss et al. 2002] Weiss JN, Chen PS, Qu Z, Karagueuzian HS, Lin SF, and Garfinkel A. Electrical restitution and cardiac fibrillation. *Cardiovasc Electrophysiol*. 2002 Mar; 13(3):292-5

[Wellner et al. 2002] Wellner M, Berenfeld O, Jalife J, Pertsov AM. Minimal principle for rotor filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 11; 99(12):8015-8

[Wiener and Rosenblueth 1946] Wiener N, Rosenblueth A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch Inst Cardiol Mex* 1946; 16:205-65

[Wiggers 1940] Wiggers CJ. The mechanism and nature of ventricular fibrillation. *Am Heart J.* 1940; 20:399-412

[Wiggers and Wegria 1940] Wiggers CJ, Wegria R. Ventricular fibrillation due to single localized induction and condenser shocks applied during the vulnerable phase of ventricular systole. *Am J Physiol* 1940; 128:500-3

[Wiggers et al. 1930] Wiggers CJ, Bell JR, Paine M. Studies of ventricular fibrillation produced by electric shock: II. Cinematographic and electrocardiographic observations on the natural process in the dog's heart: its inhibition by potassium and the revival of coordinated beats by calcium. *Am Heart J.* 1930; 5:351-65

[Winfree 1989] Winfree AT. Electrical instability in cardiac muscle: phase singularities and rotors. *J Theor Biol.* 1989 Jun 8; 138(3):353-405

[Winfree 1993] Winfree AT. How does ventricular tachycardia decay into ventricular fibrillation? In: *Cardiac Mapping*. Shenassa M, Borggreffe M. eds. Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co. Inc.; 1993: 655-80

[Wit and Janse 1992] Wit AL, Janse MJ. Experimental models of ventricular tachycardia and fibrillation caused by ischemia and infarction. *Circulation.* 1992 Jan;85(1 Suppl):I32-42. Review. PubMed PMID: 1728503.

[Witkowski et al. 1998] Witkowski FX, Leon LJ, Penkoske PA, Giles WR, Spano ML, Ditto WL, Winfree AT. Spatiotemporal evolution of ventricular fibrillation. *Nature*. 1998 Mar 5; 392(6671):78-82

[Wolk et al. 1999] Wolk P, Kane KA, Cobbe SM, Fecks XIN. Facilitation of spontaneous defibrillation by moxonidine during regional ischaemia in an isolated working rabbit heart model. *Eur J Pharmacol*. 1999 Feb 12; 367(1):25-32

[Wu et al. 2002] Wu TJ, Lin SF, Weiss JN, Ting CT, Chen PS. Two types of ventricular fibrillation in isolated rabbit hearts: importance of excitability and action potential duration restitution. *Circulation*. 2002 Oct 1; 106(14):1859-66

[Wu et al. 2004] Wu TJ, Lin SF, Baher A, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN, Ting CT, Chen PS. Mother rotors and the mechanisms of D600-induced type 2 ventricular fibrillation. *Circulation*. 2004 Oct 12; 110(15):2110-8

[Xie et al. 2004] Xie F, Qu Z, Yang J, Baher A, Weiss JN, Garfinkel A. A simulation study of the effects of cardiac anatomy in ventricular fibrillation. *J Clin Invest*. 2004 Mar; 113(5):686-93

[Xu et al. 2010] Xu B, Jacquir S, Laurent G, Bilbault JM, Binczak S. Spiral wave induced numerically using electrical stimulation and comparison with experimental results. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010;2010:2650-3. PubMed PMID:21096190

[Yamashita et al. 1998] Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M. Whole-body hyperthermia provides biphasic cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in the rat. *Circulation*. 1998 Oct 6; 98(14):1414-21

[Yamazaki et al. 2012] Yamazaki M, Honjo H, Ashihara T, Harada M, Sakuma I, Nakazawa K, Trayanova N, Horie M, Kalifa J, Jalife J, Kamiya K, Kodama I. Regional cooling facilitates termination of spiral-wave reentry through unpinning of rotors in rabbit hearts. *Heart Rhythm*. 2012 Jan;9(1):107-14.

[Yashima et al. 1999] Kim YH, Yashima M, Wu TJ, Doshi R, Chen PS, Karagueuzian HS. Mechanism of procainamide-induced prevention of spontaneous wave break during ventricular fibrillation. Insight into the maintenance of fibrillation wave fronts. *Circulation* 1999;100(August (6)):666–74.

[Zaitsev et al. 2003] Zaitsev AV, Guha PK, Sarmast F, Kolli A, Berenfeld O, Pertsov AM, de Groot JR, Coronel R, Jalife J. Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circ Res*. 2003 Mar 21; 92(5):546-53

[Zayas et al. 2000] Zayas R, Díaz-Garriga RE, Dorantes M. Dispersión del intervalo QT. Un predictor de arritmias ventriculares malignas. *Rev Cubana Cardiol Cir Cardiovasc* 2000;14(2):116-23

[Zhou et al. 1992] Zhou X, Guse P, Wolf PD, Rollins DL, Smith WM, Ideker RE. Existence of both fast and slow channel activity during the early stage of ventricular fibrillation. *Circ Res*. 1992 Apr; 70(4):773-786

[Zhou et al. 1993] Zhou X, Wolf PD, Rollins DL, Afework Y, Smith WM, Ideker RE. Effects of monophasic and biphasic shocks on action potentials during ventricular fibrillation in dogs. *Circ Res*. 1993 Aug; 73(2): 325-334

[Zimmer 1998] Zimmer, HG. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. News Physiol Sci.1998 Aug; 13:203-210

[Zipes et al. 1975] Zipes DP, Fischer J, King RM, Nicoll AB, Jolly WW. Termination of ventricular fibrillation in dogs by depolarizing a critical amount of myocardium. Am J Cardiol. 1975 Jul; 36(1):37-44

[Zipes 2010] Zipes DP. Arritmias, electrofisiología cardíaca. Ed. Marban. 2010. ISBN: 978-84-7101-466-5

Capítulo 9. **Publicaciones científicas**

En este capítulo se enumeran las participaciones en congresos científicos tanto de ámbito internacional como estatal, en forma de comunicación o presentación, de algunos resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis doctoral. Del mismo modo incluye el artículo publicado en una revista científica internacional incluida en el SCI.

Índice del capítulo

9.1 Participación en congresos internacionales	253
9.2 Participación en congresos de ámbito estatal	254
9.3 Publicación de artículos en revista	255

9.1 Participación en congresos internacionales

Han sido cuatro las ponencias presentadas en congresos internacionales, una más ha sido aceptada recientemente y se presentará el próximo mes de septiembre, los detalles:

- A Guill, E Roses, X Ibáñez-Català, A Tormos, MS Guillem, AM Climent, FJ Chorro, I Trapero, F Pelechano, LM Such-Miquel, J Millet. A novel multielectrode for epicardial recording with temperature control based in Peltier cells. Ed. Springer. Proceedings of the 4th european Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering (EMBEC'08) (ISSN 978-3-540-89207-6). pp 1-9. Antwerp (Belgium). 23-27 Nov 2008
- A Guill, I Trapero, E Roses, J Millet, A Tormos, F Pelechano, LM Such-Miquel, AM Climent, L Such, FJ Chorro. QT Dispersion Induced by Local Temperature Variations. Proceedings of the IEEE XXXV Computers in Cardiology (ISSN 0276-6574). pp 697-700. Bologna (Italy), 14-17 Sep 2008
- A Guill, A Tormos, E Roses, J Millet, MS Guillem, I Trapero, F Pelechano, LM Such-Miquel, L Such, FJ Chorro. Development of an epicardium mapping electrode for isolated heart models under thermal alterations. Proceedings of the 19th Biosignal Conference (ISSN 978-80-214-3613-8). Brno (Czech Republic), 29 Jun-1 Jul 2008

- A Guill, J Millet, A Tormos, EJ Roses, I Trapero, L Such-Miquel, FJ Chorro. QT interval modulation by local temperature changes in isolated heart models. 18th World Congress in Cardiac Electrophysiology & Cardiac Technique. Cardiostim 2012. June 13-16, 2012. Nize – France
- A Guill, J Millet, A Tormos, E Roses, F Castells, I Trapero, LM Such-Miquel, L Brines, M Zarzoso, FJ Chorro. Effects of local epicardial cooling/warming on the complexity of the ventricular fibrillatory pattern. Computers in Cardiology, CinC 2012. September 9-12, 2012. Krakow – Poland

9.2 Participación en congresos de ámbito estatal

También se han realizado tres ponencias en congresos de ámbito estatal, se detallan a continuación:

- A Guill, A Tormos, MS Guillem, J Millet, F Pelechano, L Such-Miquel, L Such, FJ Chorro. Desarrollo de un electrodo de mapeo epicárdico con capacidad de modificación de la temperatura en experimentación con modelos de corazón aislado. Libro de actas del XXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica (CASEIB 2007) (ISSN 84-612-0370-3). pp 467-470. Cartagena, 14-16 Nov 2007

- A Guill, I Trapero, F Pelechano, L Such-Miquel, A Tormos, J Millet, L Mainar, J Canoves, L Such, FJ Chorro. Dispersión del QT inducida por variaciones térmicas localizadas. XXIV Congreso de la Sociedad Valenciana de Cardiología (2007). *Latido* (ISSN 0214-3682), vol 11, num 12, pp 290-290. Castellón 9-11, May 2007
- A Guill, I Trapero, F Pelechano, L Such-Miquel, A Tormos, J Millet, L Mainar, J Canoves, L Such, FJ Chorro. Dispersión del QT inducida por variaciones térmicas localizadas. SEC 2007 - El Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60 Supl 2:1-192, pp 34-34, P176 (ISSN 0300-8932). Madrid 18-20 Oct 2007

9.3 Publicación de artículos en revista

Se ha publicado un artículo en revista científica:

- A Tormos, A Guill, J Millet, E Roses, I Trapero, LM Such-Miquel, FJChorro. New epicardial mapping electrode with warming/cooling function for experimental electrophysiology studies. *Medical Engineering & Physics* (ISSN 1350-4533). Vol. 33:pp 653-659. 2011