

# Efecte de l'exercici crònic en el desenvolupament de fibrosi cardíaca: mecanismes implicats

Gemma Gay Jordi

**ADVERTIMENT**. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA**. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING**. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# UNIVERSITAT DE BARCELONA TESI DOCTORAL

Programa de Doctorat de Biologia Cel·lular i Molecular (Universitat de Barcelona) Bienni 2006-2008

# EFECTE DE L'EXERCICI CRÒNIC EN EL DESENVOLUPAMENT DE FIBROSI CARDÍACA: MECANISMES IMPLICATS

Tesi Doctoral presentada per Gemma Gay Jordi per optar al Títol de Doctora per la Universitat de Barcelona

Directors: Dra. Anna Serrano Mollar

Dr. Josep Lluís Mont Girbau

Tutor: Albert Martínez García

Autor: Gemma Gay Jordi

Barcelona 2010

© Gemma Gay Jordi

Imatge portada:

Tinció d'a-SMA per immunofluorescència en talls histològics de teixit cardíac.

Imprés i encuadernat per: Rey center Barcelona 2010 " No hi ha enigma, si un problema es pot plantejar, és que es pot resoldre"

(Ludwig Wittenstein)

Als meus pares, a tota la meva familia i al Tito

#### AGRAÏMENTS

A l'Anna Serrano Mollar, la "jefa" per que m'encanta com viu la ciència. Ha estat com la meva mare en aquests primers passos per el món de la ciència i la investigació. Ets la meva amiga i m'agradaria expressar el meu agraïment per tot el que m'has ensenyat i el que aprenc cada dia al teu costat. Amb tots aquests anys hem compartit molts moments, gairebé tots bons i estic molt contenta d'haver tingut aquesta sort.

Al Dr. Josep Lluís Mont i Girbau, per la il·lusió amb que va començar aquest projecte i per incloure'm en el seu grup. Per les reunions i converses que hem tingut, per buscar com finançar aquest projecte i per els seus comentaris sempre trencadors.

Al Dr. Josep Brugada per acceptar-me com a becària, per la seva col·laboració i suport durant aquest temps. Juntament amb el Lluís han estat els pares d'aquest treball i els agraeixo la confiança dipositada.

A l'Oriol Bulbena perquè si l'Anna ha estat la mare, ell és l'avi. Sempre està disposat a ajudar i donar consells, i quan em quedo fins tard em porta un xocolata calentet per alimentar les neurones. Moltes gràcies per tot.

Al Josep Manuel Grases, sempre que he parlat amb ell m'ha ajudat molt. Si un bon dia no haguéssim tingut una conversa telefònica segurament no hagués escrit aquesta tesi.

Al Dani que sempre té la porta del despatx oberta. És un bon jefe, només mirant-lo aprens. La seva passió per la ciència no té límits, així com tampoc la seva paciència, tot i que ho intenti dissimular amb els seus renecs ocasionals. Tenir-te a prop és molt maco i estimulant.

Al Dr. Emili Gelpí, per acceptar-me com a becària quan ell era director d'aquests centre, a la Dra. Cristina Sunyol per fer-ho ara i al Dr. Albert Martínez per acceptar la tutoria d'aquesta tesi.

A tota la gent que hi havia al centre quan vaig començar perquè anava una mica perduda i tothom a qui vaig preguntar va tenir la paciència d'ensenyar-me com anaven les coses. A l'Ester, la Michaela, el Dani i en Tico que em portaven a fer café els meus primers matins. A la Maria que varem compartir poiata i estabulari tants dies, per ser fundadora de l'AITÉ i per la seva enorme simpatia.

Al Nachete perquè és el nostre Nacho-Macho, per la seva alegria. Per totes les hores que hem compartit dins i fora del laboratori, per escoltar-me sempre que m'ha fet falta i per els seus balls a la terrassa.. per molta feina que es tingui, amb un Nachete al costat passa volant.

A la Valeria, que va ser el nostre regalito de San Valentin. La seva arribada va ser tot un esdeveniment per a mi. Què puc dir que no sàpigues, ja?. Hem compartit molta feina, bones estones, riures i penes i espero que ho continuarem fent. La nova reina del westernblot! (per votació popular), jeje. He d'agraïr-li entre altres moltes coses els magnífics dibuixos que ha fet per aquesta tesi, moltes gràcies!!

A la Raquel, que no sé si fa dos dies o tota la vida que ens coneixem i vens per aquí. Ets un solete, treballadora com ninguna i m'agrada molt com rius. Estic molt contenta de treballar amb un grup com aquest que fem, m'ho passo bé i espero que continuem avançant plegats fins ben lluny.

A la Sabrina per que és única. En la vida del lab és com la nostra veïna per que és de los "otros", però la sentim com una germana més. M'encanta el seu vocabulari i tota ella en general, gràcies per deixar-me els coberts per dinar i per tenir la paciència d'aguantar-nos quan tens gana i nosaltres et diem "ara 'nem".

A la Montse, per tots els moments que hem compartit al llarg d'aquesta tesi. Per que recordo quan vas arribar al lab. Gràcies a tu no em va caldre agenda per recordar quan tocava anar a classe de doctorat. Per totes les converses i moments que hem tingut i per que ets un gitanocoot!, ja saps que t'estimo molt.

Al Ferran per ser un esbojarrat i a la Paty, per les estones que vam passar juntes. A tota la setena, en especial als de la Gina, que hem compartit laboratori. Als que marxeu us trobarem a faltar. També agraïr al Petar, la Joana, la Natalia, el Kevin i el Luís l'aire fresc que han portat a la setena i la seva disponibilitat sempre que tenim un lio amb el confocal. Al Jordi fitri, la Mercedes, el Rubén i l'Alghara perquè sempre que m'ha fet falta algún reactiu o anticòs me l'han deixat amb molt de gust. Ténen de tot, en saben molt i són majetes, és un plaer treballar amb tots vosaltres. En extensió a tots els companys de l'IIBB, perquè en general sempre estan disposats a donar un cop de mà quan fa falta.

A l'Eduard i la Begonya per el temps i la feina compartida.

Als diferents personals de l'estabulari per l'ajuda i la companyia. A l'Edu i el Julio per totes les vegades que els he anat a molestar perquè se'm mirin els ordinadors. A la Tere i l'Emi perquè ens cuiden molt.

A l'Eduguca, el David, l'Etel i el Diego pel turisme a Boston, uns nachos esplendits. Amb vosaltres he aprés que l'NBA té molt a envejar al bàsquet i l'afició d'aqui. Gràcies per treure'm a passejar, per les birrilles i per els riures.

A l'Edu, la Merxe, l'Oriol i l'Annusko per els momentos Friends, i per tota la resta també. M'agrada molt tenir-vos com amics, sou els millors!

Al Vicenç, el meu titi, perquè el camino que lleva a tu casa és mi alegria, jeje. T'estimo molt. Gràcies per tot el que em viscut, per fer-me riure i per treure'm pes de sobre quan he estat una mica enfonsada.

A tota la meva família, que no és molt gran però és collonuda (amb perdó per l'expressió). Sempre estan a prop quan els necessito, m'escolten i m'animen a seguir. Sóm tots diferents però estem ben avinguts i és molt important. Em sap molt de greu que el padrí no pugui compartir amb nosaltres aquest moment, sempre el portaré dins com us porto a tots vosaltres. Al tots els meus avis i avies: gràcies per totes les celebracions, pels estius a Tremp i a Talarn, per les conserves de tomàquet, per ensenyar-me a nedar i portar-me al lago, per deixar-me els pis de Barcelona, per les escursions, per la guerra que teníeu per fer-me menjar i per moltes més coses. Al meu Tiet Joan per ser el meu primer fan, gràcies pels jocs, sempre m'he sentit molt a gust amb tu i gràcies per la fe que tens posada amb mi. A la meva tieta Nati per que és la meva tieta de sang, jeje, ets un sol de persona. A la Tieta Juani, per les guerres que teníem quan era petita, per cóm és, per que fa el millor "pulpo" del món i per totes les passejadetes que hem fet per Tremp. Al tiet Javi per portar-nos de festa major i a buscar bolets i cargols, per la paciència de passar part de les vacances amb una nena lianta com jo. A la Nicole i els nens, que fa poquet que són de la familia però m'els estimo molt. Finalment, als meus pares i al meu germà. Al Marc per ser el germà gran, pels consells que m'ha donat, pels "calvots" i el et faré xixina, entre altres moltes coses. Als meus pares per tot el que han patit fins arribar aquí. Els hauria d'agrair tantes coses, per ser com són i per ensenyar-me a ser com sóc, us estimo molt.

A tots aquells que m'hagi oblidat mencionat, moltes gràcies per ajudar-me també!

# ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1	
1.1 ANATOMIA I FISIOLOGIA DEL COR	3	
1.1.2. Cicle cardíac, origen i propagació elèctrica		
1.1.3. Organització i estructura del miocardi	8	
1.1.3.1. Matriu extracel·lular	10	
1.1.3.2. Miòcits cardíacs	11	
1.1.3.3. Fibroblasts	12	
1.2. EFECTES DE L'EXERCICI SOBRE L'ESTRUCTURA I LA FUNCIÓ		
CARDÍACA	14	
1.2.1. Tipus d'exercici	15	
1.2.2. Processos fisiològics i d'adaptació a l'exercici	16	
1.3. FISIOPATOLOGIA DE L'HIPERTRÒFIA I DE LA FIBROSI CARDÍACA		
1.3.1. Paper del sistema Renina-Angiotensina en la fibrosis cardíaca	22	
1.3.2. Factors de creixement, enzims i proteïnes de la matriu		
extracel·lular	23	
1.3.2.1. TGF- β1	24	
1.3.2.2. Fibronectina-1	25	
1.3.2.3. MMPs	25	
1.3.2.4. TIMPs	27	
1.3.2.5. Col·làgens fibril·lars tipus I i tipus III	28	
1.4. MODELS ANIMALS	29	
2. OBJECTIUS	31	
Objectiu 1	33	
Objectiu 2	33	
Objectiu 3	33	

3. MATERIALS I MÈTODES	35	
3.1. MODEL EXPERIMENTAL		
3.1.1. Animals d'experimentació	37	
3.1.2. Protocol d'exercici	37	
3.2. DISSENYS EXPERIMENTALS	39	
3.2.1. Estudi 1: Evolució de la fibrosi cardíaca induïda per l'exercici	39	
3.2.1.1. Valoració dels canvis estructurals per ecocardiografia	39	
3.2.1.2. Valoració de la inducibilitat d'arítmies "in vivo"		
i índex de Fulton	40	
3.2.1.3. Anàlisi estadístic	40	
3.2.2. Estudi 2: Avaluació de la reversió de la fibrosi cardíaca		
induïda per exercici	41	
3.2.2.1. Anàlisi estadístic	41	
3.2.3. Estudi 3: Efecte del Losartan en la prevenció de la fibrosi cardíaca	43	
3.2.3.1. Anàlisi estadístic	42	
3.3. PARÀMETRES ESTUDIATS	43	
3.3.1. Hipertròfia cardíaca	43	
3.3.2. Dimensions i funció cardíaca per ecocardigrafia	44	
3.3.3. Electrofisiologia i estimulació cardíaca	44	
3.3.4. Histologia	45	
3.3.4.1. Tricròmica de Masson	45	
3.3.4.2. Vermell de Picrosirius	46	
3.3.4.3. Immunofluorescència	46	
3.4. DETERMINACIONS EN TEIXIT	48	
3.4.1. Hidroxiprolina	48	
3.4.2. RT- PCR	48	
3.4.3 Western-Blot	50	

4.1. ESTUDI 1 : EVOLUCIÓ DE LA FIBROSI CARDÍACA PROVOCADA		
PER L'EXERCICI	59	
4.1.1 Hipertròfia cardíaca i valoració dels canvis estructurals per		
ecocardiografia	59	
4.1.1.2 Histopatologia i anàlisi del grau de fibrosi	63	
4.1.1.3 Immunofluorescència	65	
4.1.2. Anàlisi de l'expressió d'mRNA		
4.1. 3. Anàlisis de Proteïnes per Western-Blot	70	
4.1.4. Canvis en la conducció elèctrica: remodelat elèctric	72	
4.2. ESTUDI 2: AVALUACIÓ DE LA REVERSIÓ DE LA FIBROSI CARDÍACA		
INDUÏDA PER L'EXERCICI	73	
4.2.1 Hipertròfia	73	
4.2.2. Histopatologia i anàlisi del grau de fibrosi	75	
4.2.3. Anàlisi de l'expressió d'mRNA	77	
4.3. ESTUDI 3: EFECTE DEL LOSARTAN EN EL DESENVOLUPAMENT		
DE LA FIBROSI CARDÍACA	82	
4.3.1 Hipertròfia cardíaca	82	
4.3.2. Histopatologia	83	
4.3.3. Anàlisi de la expressió d'Mrna	84	
4.3.4. Anàlisis de Proteïnes per Western-Blot	88	
5. DISCUSSIÓ	95	
6. CONCLUSIONS	107	
7. BIBLIOGRAFIA	111	
8. APÈNDIX	135	

### ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1:	Representació del sistema cardiovascular	3
Figura 2:	Pericardi i capes del cor	4
Figura 3:	Dibuixos representatius de l'anatomia del cor	5
Figura 4:	Electrocardiograma	7
Figura 5:	Estructura i composició del teixit miocardíac	8
Figura 6:	Miòcits cardíacs	11
Figura 7:	Esquema representatiu de les accions que realitza un fibroblast	
	durant els processos de remodelat i reparació	13
Figura 8:	Representació esquemàtica de les principals vies relacionades	
	amb el desenvolupament de fibrosi cardíaca	21
Figura 9:	Comunicació entre miòcits, fibroblasts i matriu extracel·lular	
	durant una situació de sobrecàrrega de pressió	22
Figura 10:	Esquema del tall transversal dels ventricles del cor	43
Figura 11 :	Gruixos de les parets ventriculars normalitzats per el pes corporal	61
Figura 12:	Tricròmica de Masson (estudi 1)	62
Figura 13:	Vermell de picrosirius (estudi 1)	63
Figura 14:	Analis morfomètric de la deposició de col·lagen (estudi 1)	64
Figura 15:	Determinació dels nivells d'hidroxiprolina (estudi 1)	65
Figura 16:	Immunofluorescència de talls histològics del ventricle dret	
	dels grups sedentari i exercici a 16 setmanes (estudi 1)	66
Figura 17:	Expressió d'mRNA del TGF-β1 (estudi 1)	67
Figura 18:	Expressió d'mRNA de la Fibronectina-1 (estudi-1)	67
Figura 19:	Expressió d'mRNA de la MMP-2 (estudi 1)	67
Figura 20:	Expressió d'mRNA del TIMP-1 (estudi 1)	68
Figura 21:	Expressió d'mRNA de Procol·lagen-I (estudi 1)	68
Figura 22:	Expressió d'mRNA del Procol·lagen-III (estudi 1)	69
Figura 23:	Nivells d'expressió proteica de TGF-β1 l Fibronectina-1 (estudi 1)	70
Figura 24:	Nivells d'expressió proteica de la MMP-2 i TIMP-1 (estudi 1)	71
Figura 25:	Nivells d'expressió proteica de Col·lagen-I i Col·lagen-III (estudi 1)	71
Figura 26:	Conducció elèctrica (estudi 1)	72
Figura 27:	Gruix de les parets ventriculars (estudi 2)	74
Figura 28:	Tricròmica de Masson i Vermell de picrosirius (estudi 2)	75
Figura 29:	Anàlisi quantitatiu de la deposició de col·lagen (estudi 2)	76
Figura 30:	Nivells d'hidroxiprolina en els diferents grups experimentals	
	(estudi 2)	76
Figura 31:	Immunofluorescència per $\alpha$ -SMA (estudi 2)	77

Figura 32:	Expressió d'mRNA del TGF-β1 (estudi 2)	78
Figura 33:	Expressió d'mRNA de la Fibronectina-1 (estudi 2)	78
Figura 34:	Expressió d'mRNA de la MMP-2 (estudi 2)	79
Figura 35:	Expressió d'mRNA del TIMP (estudi 2)	79
Figura 36:	Expressió d'mRNA del Procol·lagen-I (estudi 2)	80
Figura 37:	Expressió d'mRNA de Procol·lagen-III (estudi 2)	81
Figura 38:	Gruixos de les parets ventriculars (estudi 3)	83
Figura 39:	Tricròmica de Masson i Vermell de Pircrosirius (estudi 3)	84
Figura 40:	Expressió d'mRNA del TGF-β1 (estudi 3)	85
Figura 41:	Expressió d'mRNA de la Fibronectina-1 (estudi 3)	85
Figura 42:	Expressió d'mRNA de la MMP- (estudi 3)	86
Figura 43:	Expressió d'mRNA del TIMP-1 (estudi 3)	87
Figura 44:	Expressió d'mRNA del Procol·lagen-I (estudi 3)	87
Figura 45:	Expressió d'mRNA del Procol·lagen-III (estudi 3)	88
Figura 46:	Nivells d'expressió proteica pel TGF-β1 (estudi 3)	89
Figura 47:	Nivells d'expressió proteica de Fibronectina-1 (estudi 3)	90
Figura 48:	Nivells d'expressió proteica de MMP-2 (estudi 3)	91
Figura 49:	Nivells d'expressió proteica de TIMP-1 (estudi 3)	92
Figura 50:	Nivells d'expressió proteica de Col·lagen-I (estudi 3)	92
Figura 50:	Nivells d'expressió proteica de Col·lagen-I (estudi 3)	93

## ÍNDEX DE TAULES

Taula 1.	Sondes TaqMan emprades en Real Time PCR	50
Taula 2.	Anticossos primaris utilitzats en el Western Blot	55
Taula 3.	Anticossos secundaris utilitzats en el Western Blot	55
Taula 4.	Pes corporal, pes del cor i proporció entre pes del cor/pes corporal	
	(estudi 1)	59
Taula 5.	Pes de les diferents parets cardíaques dels grups experimentals	
	de 16 setmanes (estudi 1)	60
Taula 6.	Paràmetres ecocardiogràfics en animals sedentaris i exercici	
	a les 8 i a les 16 setmanes (estudi 1)	62
Taula 7.	Paràmetres electrofisiològics del ventricle dret a les 6 setmanes	
	(estudi 1)	62
Taula 8.	Pes corporal, pes del cor i proporció entre pes del cor/pes corporal	
	(estudi 2)	62
Taula 9.	Pes corporal, pes del cor i proporció entre pes del cor/pes corporal	
	(estudi 3)	62

#### ABREVIATURES

TGF-<sub>β</sub>: factor de creixement transformant beta

MMPs: metal·loproteïnases

MMP-2: metaloproteinasa-2

cTnT: troponina cardíaca tipus T

cTnI: troponina cardíaquca tipus I

PNB: pèptid natriurètic tipus B

TIMPs: Inhibidors tissulars de les metal·loproteïnases.

TIMP-1:Inhibidor tissular de metaloproteinases-1-

ECM: Matriu extracel·lular.

ACE-1: l'enzim convertidor d'angiotensina

AT1: receptor tipus 1 de l'Angiotensina

AT2: receptor tipus 2 de l'Angiotensina

 $TNF\alpha$  : factor de necrosi tumoral alfa

IL-6: interleuquina-6

ET-1: endotelina-1

VEGF: factor de creixement de l'endoteli vascular

AD: aurícula dreta

AE: aurícula esquerra

VD: ventricle dret

VE: ventricle esquerra

VE-pll: paret lliure del ventricle esquerra

IV: septe interventricular

 $\alpha$ -SMA: actina de múscul llis alfa

FICT: isocianat de fluoresceïna

BSA: Albúmina Sèrica Bovina

Pc: Pes corporal.

DVEd: Diàmetre del ventricle esquerre al final de la diàstole.

DVEs: Diàmetre del ventricle esquerre al final de la sístole.

IV: Gruix de la paret del septe interventricular.

PpVE: Gruix de la paret posterior del ventricle esquerre.

FE: Fracció d'Ejecció. Ric: Temps corregit de relaxació isovolumètrica.

DVD: Diàmetre del ventricle dret. PIIVD: Gruix de la paret lliure del ventricle dret.

TAPSE: Excursió de l'anell tricuspide durant la sistole.

Sm: velocitat de moviment en la paret lateral del ventricle dret.

Velocitat E: Pic de velocitat de l'emplenament inicial.

E DT: Desacceleració de la ona E.

DAEs: Diàmetre de l'aurícula esquerra al final de la sístole

PRVE: periòde refractari ventricular efectiu

ECG: Electrocardiograma

S: Sedentari.

- E: Exercici 16 stmanes.
- R2: Repòs 2 setmanes.
- R4: Repòs 4 setmanes.
- R8: Repòs 8 setmanes.
- E + LOS: Exercici + Losartan.
- S + LOS: Sedentari + Losartan.

INTRODUCCIÓ

#### 1. INTRODUCCIÓ

En les últimes dècades s'ha evidenciat que dur un estil de vida sedentari incrementa el risc de patir malalties cardiovasculars augmentant la morbiditat i mortalitat (<sup>1-4</sup>). En aquest sentit, nombrosos estudis demostren que l'exercici físic ajuda a prevenir les malalties cardiovasculars (<sup>5-9</sup>). La pràctica moderada d'activitat física, duta a terme amb regularitat, aporta beneficis com ara: millores en el benestar en general (<sup>10</sup>), en el perfil de lipoproteïnes plasmàtiques (<sup>11</sup>) i en la funció endotelial (<sup>12</sup>). Ara bé, quan l'exercici es practica d'una forma intensa i continuada, amb el pas del temps origina una sèrie de canvis estructurals en el cor. Generalment, aquests canvis s'han considerat com un seguit d'adaptacions fisiològiques, que optimitzen la funció cardíaca. No obstant, diversos estudis realitzats recentment han observat en determinades modalitats i pràctiques esportives que l'exercici pot provocar anomalies en la funcionalitat i la bioquímica del cor (13-16). En aquest sentit, últimament s'han fet públics diversos casos d'atletes d'alt rendiment que han mort sobtadament o han necessitat la implantació de dispositius per controlar arítmies cardíaques (13;17;18). Aquests casos, sumats al nombre creixent d'evidències científiques que demostren l'existència de dany cardíac posterior a una pràctica intensa i continuada d'exercici (<sup>13;14;19</sup>), posen de manifest la necessitat d'estudiar més exhaustivament aquest tema per tal d'esclarir els mecanismes pels guals es produeixen aguests fenòmens.

#### 1.1. ANATOMIA I FISIOLOGIA DEL COR

El cor és l'òrgan principal del sistema circulatori (Figura 1). Es pot considerar com



Figura 1: Representació del sistema cardiovascular

una bomba biològica pulsativa, que manté el flux sanguini circulant per les artèries i venes amb el cabal i la pressió adients per irrigar cada òrgan. En l'ésser humà el cor esta situat dins la caixa toràcica, al mediastí, entre els pulmons, directament darrera de l'estern i per sobre del diafragma. En un individu adult, la seva mida és aproximadament la d'un puny tancat i té un pes mitjà de 250 g en les dones i 300 g en els homes.

Envoltant i protegint el cor es troba el pericardi,

un sac format per dues capes (Figura 2A). La capa més superficial o externa, anomenada pericardi fibrós, està unida a la espina dorsal, el diafragma i a l'estern i

envolta el naixement dels principals vasos sanguinis del cor. Gràcies a aquests lligaments, el pericardi fibrós manté el cor en la seva posició, al mateix temps que permet la mobilitat necessària per a la seva contracció (<sup>20;21</sup>). Aquesta membrana també impedeix que el cor s'ompli excessivament i esdevé una barrera contra la propagació de infeccions. La capa interna del pericardi, o pericardi serós, és una fina membrana que recobreix la superfície del cor i s'encarrega de secretar líquid pericardíac a l'espai que es forma entre el pericardi i la primera capa de la paret cardíaca (epicardi). Aquest fluid actúa com a lubricant i evita la fricció entre ambdues membranes durant el batec el cor. Anatòmicament desprès del pericardi es troba la paret cardíaca que esta formada per tres capes: l'epicardi, el miocardi i l'endocardi (Figura 2B).



Figura 2: Pericardi i capes del cor. A) Pericardi. B) Capes de la paret cardíaca

L'epicardi és la capa més externa del cor i està constituïda per cèl·lules mesotelials, teixit connectiu i vasos sanguinis. El miocardi (la capa intermèdia) és la més gruixuda i dóna lloc a la musculatura cardíaca. Principalment es composa de cèl·lules excitables (miòcits cardíacs) que es contrauen quan són estimulades per les seves cèl·lules veïnes (<sup>22</sup>). L'endocardi, és la capa que recobreix la superfície interna del cor i està formada per diferents làmines de cèl·lules endotelials i teixit connectiu.

Morfològicament, el cor es divideix en quatre cambres; les aurícules són les dues cambres superiors i els ventricles les inferiors. Per tal d'optimitzar el consum cardíac aquestes quatre cambres es contrauen de manera rítmica i organitzada (<sup>23;24</sup>). Les aurícules reben la sang procedent dels pulmons i de la circulació sistèmica, i els ventricles bombegen la sang cap als pulmons i la resta de l'organisme. Les aurícules es comuniquen amb els ventricles a través de l'obertura que deixen les vàlvules

auriculoventriculars (tricúspide i mitral), mentre que les vàlvules aòrtica i pulmonar separen els ventricles de les artèries. Les cavitats de la part dreta del cor estan separades de les cavitats de la part esquerra per septes. S'anomena septe interauricular l'envà que separa les dues aurícules i septe interventricular el que separa els dos ventricles (Figura 3A).



*Figura 3: Dibuixos representatius de l'anatomia del cor. A) Artèries, venes, cavitats i vàlvules del cor. B) Sistema de conducció elèctrica del cor* 

#### 1.1.2. Cicle cardíac, origen i propagació elèctrica

Es defineix com a cicle cardíac la seqüència d'esdeveniments que tenen lloc durant un batec complet. El cicle cardíac comença amb la diàstole, o fase d'emplenament. Aquest procés té lloc quan s'obren les vàlvules auriculoventriculars. A través d'aquesta obertura, la sang flueix cap als ventricles per diferència de pressió. Cap al final d'aquesta fase es produeix la contracció de les aurícules, aquest fenomen es coneix com a sístole auricular i serveix per acabar d'omplir de sang els ventricles. Posteriorment, té lloc la sístole ventricular, que comença amb el tancament de les vàlvules auriculoventriculars i segueix amb la contracció isomètrica dels ventricles. La pressió dins dels ventricles va augmentant fins que s'obren les vàlvules aòrtica i pulmonar i la sang és expulsada, buidant-se les cambres ventriculars. La relaxació ventricular que té lloc a continuació, provoca que les vàlvules aòrtica i ventricular es tanquin i s'obrin les vàlvules atrioventriculars, iniciant un nou cicle.

La capacitat del cor per bategar es manifesta durant el desenvolupament embrionari i continua durant tota la vida. Els impulsos elèctrics que inicien el cicle cardíac s'originen en el node sinoauricular. Aquest node mesura aproximadament 3 mm d'ample i 1,5 cm de llargada i es troba situat en la part superior de la aurícula dreta. Les cèl·lules que formen aquest teixit tenen la capacitat d'excitar-se a si mateixes, és a dir, no requereixen de cap estímul extern per a iniciar un potencial d'acció. Per aquest motiu el node sinoauricular es considera el marcapassos natural del cor (Figura 3B). Tot i que el node sinoauricular genera estímuls elèctrics a un ritme d'un potencial per segon, la freqüència exacta del ritme cardíac està regulada per el sistema neurovegetatiu segons les necessitat que té l'organisme en cada moment.

Un cop generat el potencial d'acció, aquest s'estén ràpidament a tot el teixit auricular, estimulant la contracció de les aurícules. L'estructura de teixit fibrós que es troba formant part i envoltant les vàlvules auriculoventriculars, impedeix que l'impuls elèctric passi per contacte dels miòcits de les aurícules als miòcits dels ventricles. Aquesta conducció requereix d'un sistema de fibres especialitzades que distribueix apropiadament l'impuls elèctric fins als ventricles i aconsegueix sincronitzar la seva contracció (Figura 3B). Partint del node sinoauricular, l'impuls es condueix a través de les vies internodals fins al node auriculo-ventricular. Durant aquesta part del trajecte el senyal es transmet a molt poca velocitat, introduint el retard necessari per la contracció de les aurícules. A la sortida d'aquest node, l'impuls connecta amb el feix auriculoventricular o de His, que es divideix en dues branques que acaben ramificantse en el sistema de fibres de Purkinge. Aquestes fibres estan connectades amb els miòcits del miocardi ventricular i es caracteritzen per tenir una velocitat de conducció molt alta.

Exceptuant el node sinoauricular, tots els miòcits cardíacs posseeixen un període refractari, és a dir un interval de temps durant el qual la cèl·lula que ha sofert un impuls no pot ser excitada de nou. Gràcies a això, el front d'ona que propaga la contracció cardíaca avança únicament en una direcció. Aquest cicle és el que controla la contracció asincrònica d'aurícules i ventricles i que es pot observar en un electrocardiograma. En la figura 4 es mostra un exemple d'un electrocardiograma amb la descripció del procés.



*Figura 4: Electrocardiograma. Traçat típic corresponent a un batec. Es poden diferenciar clarament tres ones: P, QRS i T.* 

- La ona P representa la despolarització auricular.
- El complex QRS representa la despolarització ventricular ràpida.
- La ona T correspon a la fase de repolarització.

La mida i el perfil de les ones dónen una idea de la presència d'anomalies. Per exemple, una ona P gran indica engrandiment auricular. Una ona Q major indica infart de miocardi. Si la ona R és més gran equival a un engrandiment ventricular. Una ona T aplanada fa referència a una menor presencia d'oxigen del que seria normal i una ona T elevada a una situació d'hiperpotassèmia. L'espai de temps transcorregut entre les diferents ones també genera informació. Els fragments principals són els intervals P-Q i Q-T i el segment S-T.

- Interval P-Q: Temps de conducció des del començament de l'excitació auricular fins a l'inici de la despolarització ventricular. És el temps requerit perquè un potencial d'acció viatgi per les aurícules, el node atrioventricular i les fibres del sistema de conducció. Quan en el teixit cardíac hi ha cicatrius el potencial es desvia i aquest interval es prolonga.
- El segment S-T: Temps durant el qual les fibres ventriculars contràctils estan despolaritzades en la fase plateau. Aquest interval es troba elevat quan el cor rep una quantitat d'oxigen insuficient i és més llarg quan hi ha una situació d'hipocalcèmia.
- El interval Q-T: Representa la duració total de la sístole ventricular. És a dir el temps transcorregut des del principi de la despolarització ventricular fins al final de la repolaritzacio del ventricle. Es pot allargar per lesió miocardíaca, isquèmia, o anomalies de la conducció.

#### 1.1.3. Organització i estructura del miocardi

El miocardi està format per una complexa combinació de miòcits, fibroblasts i altres cèl·lules que es troben incloses dins d'una densa matriu de proteïnes i polisacàrids. Clàssicament, l'estructura del miocardi s'ha descrit com el conjunt format per dues parts: el parènquima funcional integrat per miòcits i l'espai intersticial. L'espai intersticial esta format bàsicament per elements fibril·lars com el col·lagen, cèl·lules d'origen mesenquimàtic (principalment fibroblasts), vasos sanguinis i limfàtics i terminacions nervioses (Figura 5).



Figura 5: Dibuix representatiu de l'estructura i composició del teixit miocardíac. a) miòcits. b) vasos sanguinis. c) fibroblasts. d) matriu extracel·lular.



La funció cardíaca es regula segons les interaccions dinàmiques entre els dos tipus cel·lulars majoritaris (miòcits i fibroblasts) i la complexa xarxa extracel·lular que els envolta (<sup>25-27</sup>). Fonamentalment, l'organització i estructura del teixit miocardíac es manté en totes les cambres del cor. Els miòcits ocupen gairebé tot l'espai del teixit miocardíac i s'encarreguen de les contraccions del cor. Els fibroblasts, més abundants en número, són la font principal de components de la matriu extracel·lular i la matriu extracel·lular és la bastida que sustenta les diferents cèl·lules del miocardi.

Tot i les semblances generals, cada cavitat cardíaca està sotmesa a una intensitat de treball diferent. En conseqüència, el teixit miocardíac que les forma esta adaptat a la funció que realitza i presenta lleugeres diferències que són característiques per cada una d'elles. La diferència més destacada és el gruix de la paret, que ve determinat

per la quantitat de capes de cèl·lules que formen les parets de cada una de les cambres cardíaques. La funció de les aurícules és recollir la sang mentre les vàlvules auriculoventriculars estan tancades per després deixar-la caure als ventricles. Per tant, les seves parets no estan sotmeses a pressions elevades i en conseqüència les seves parets són fines. En canvi els ventricles, que bombegen la sang a tot el cos, estan sotmesos a pressions més elevades i per tant presenten uns gruixos de les parets cardíaques majors. Entre els dos ventricles, el dret s'encarrega de bombejar la sang a la circulació pulmonar i l'esquerre a la circulació perifèrica. El ventricle dret bombeja la sang a una distància petita, a poca pressió i contra poca resistència, per tant té una càrrega de treball menor que el ventricle esquerre que ha de bombejar la sang a grans distàncies, a gran pressió i contra una resistència elevada. En conseqüència, el ventricle esquerre té una paret miocardíaca més gruixuda ja que per mantenir la mateixa velocitat de flux sanguini realitza un esforç de treball més intens que el dret.

A nivell microscòpic, l'ultraestructura del miocardi també presenta variacions entre les diferents cambres cardíagues. Essencialment, la proporció de proteïnes de la matriu extracel·lular i la composició cel·lular és la mateixa per tot el miocardi. No obstant, cada paret cardíaca presenta lleugeres diferencies per tal d'ajustar la composició del miocardi a la funció que realitza. Per exemple, per dur a terme la seva funció, el teixit de les aurícules no s'estira ni es contrau amb la mateixa força que qualsevol dels ventricles. Per tant, les propietats elàstiques i la rigidesa del teixit de les aurícules és diferent que la dels ventricles. De la mateixa manera, el ventricle dret no ha de realitzar la mateixa força de contracció que l'esquerre. A banda del gruix de les parets, la proporció entre les proteïnes que formen la matriu extracel·lular és el que determina les característiques elàstiques i la rigidesa del teixit miocardíac. Fonamentalment, aquestes proteïnes són els col·làgens tipus I i tipus III. En aquest sentit, hi ha molts estudis que indiquen que els col·làgens tipus I i tipus III es troben en diferents quantitats i disposició en funció de la cavitat avaluada (<sup>28;29</sup>). El col·lagen tipus I aporta rigidesa al teixit i el col·lagen tipus III elasticitat, per tant, les aurícules presenten una proporció de col·lagen tipus I respecte col·lagen tipus III més elevat que els ventricles. Tenint en compte que els fibroblasts són els encarregats de sintetitzar la majoria de components de la matriu extracel·lular, és normal que aquests presentin diferències en el seu fenotip i grau d'activació segons la cambra cardíaca de la qual procedeixin. Per tal de que el cor funcioni correctament és molt important que l'arquitectura del teixit es mantingui constant. Petits canvis en la quantitat o la distribució de cèl·lules i proteïnes de la matriu extracel·lular poden distorsionar la funció cardíaca i desencadenanr diversos estats patològics.

Històricament, els miòcits han estat el centre d'atenció de la majoria d'estudis científics. No obstant, en l'actualitat es coneix que tots els components cel·lulars i de la matriu extracel·lular participen activament en la funció cardíaca, tant en condicions normals com en el desenvolupament de diferents estats patològics.

#### 1.1.3.1 Matriu extracel·lular

La matriu extracel·lular lluny de ser una simple estructura de suport estàtica és una entitat activa i dinàmica que juga un paper molt important en el desenvolupament, la morfologia i la senyalització cardíaca. La matriu extracel·lular esta organitzada en una complexa malla tridimensional que rodeja miòcits, fibroblasts i elements vasculars del cor (<sup>30</sup>). D'aquesta manera permet mantenir l'orientació de la massa muscular, l'alineament individual dels miòcits i la distensió passiva del cor. Principalment esta formada per col·lagen fibril·lar tipus I (80-85%), i tipus III (10-15%). També conté laminina, entactina i fibronectina (<sup>31</sup>). En menor quantitat, i a nivell de les membranes basals, conté fibrilina i col·lagen tipus IV i V, i en molt poca quantitat elastina glicosaminoglicans i glicoproteïnes (<sup>32</sup>). Aquesta rica diversitat de components és de vital importància ja que permet que la matriu extracel·lular pugui dur a terme diferents funcions.

Els col·làgens I i III són la base de la matriu extracel·lular, mantenen la integritat estructural i sostenen la resta de components cel·lulars i no cel·lulars del teixit cardíac. La resta de proteïnes de la matriu extracel·lular es troben ancorats a aquesta base de col·làgens fibril·lars. Dins de l'estructura de la matriu extracel·lular, la membrana basal és la part que es troba immediatament al voltant de les cèl·lules. La fibronectina, els proteoglicans o els col·làgens tipus IV i V són proteïnes típiques de les membranes basals. Aquestes proteïnes juguen un paper molt important en la senyalització cel·lular ja que interaccionen amb receptors de membrana i uneixen factors de creixement i enzims proteolítics. La matriu extracel·lular i els components cel·lulars als que rodeja es transmeten informació mitjançant l'interacció entre proteïnes de la membrana basal i receptors de membrana com les integrines (<sup>33;34</sup>). El reservori de factors de creixement i enzims que hi ha ancorats a la matriu extracel·lular també tenen un paper important en la senyalització i el recanvi cel·lular. Un cop alliberats de l'ancoratge a la matriu, factors de creixement com el factor de creixement transformant beta (TGF-β) i enzims proteolítics com les metal·loproteïnases (MMPs), queden activats. Un cop actius, poden dur a terme les seves funcions i participar en processos de proliferació, migració cel·lular i remodelat tissular.

#### 1.1.3.2. Miòcits cardíacs

Els miòcits cardíacs, tot i que comparteixen moltes característiques amb les cèl·lules de la musculatura estriada esquelètica, presenten una sèrie de característiques que els diferència i especialitza en la funció que els correspon (Figura 6).



*Figura 6: Miòcits cardíacs. A) Ampliació detallada de l'unió entre cèl·lules adjacents. B) Disposició dels principals components d'una fibra muscular cardíaca.* 

Els miòcits del cor tenen una estructura ramificada en forma de pantalons amb el nucli localitzat al centre. En general, un miòcit típic mesura entre 50 i 100  $\mu$ m de

longitud i té un diàmetre aproximat de 14 µm. La seva característica més destacada és el sistema de connexió amb les cèl·lules veïnes a través dels discs intercalars. Aquestes, contenen desmosomes i formen unions permeables al llarg de l'eix longitudinal, o "gap junctions", que permeten el ràpid flux d'ions necessari per la propagació dels potencials d'acció responsables de les contraccions cardíaques. A més, donades les necessitats d'haver de funcionar constantment i la poca disposició d'espai per emmagatzemar energia, els miòcits estan especialitzats en l'obtenció ràpida d'energia mitjançant una alta concentració de mitocòndries i un aprofitament total de l'oxigen.

#### 1.1.3.3. Fibroblasts

Els fibroblasts són el tipus cel·lular més nombrós en el cor, són cèl·lules actives amb gran producció i secreció de proteïnes de la matriu extracel·lular, factors de creixement i citocines. Aquest tipus cel·lular està present en la majoria de teixits de l'organisme ja que són els encarregats de la síntesis i deposició de la matriu extracel·lular. En el cor, els fibroblasts generen l'esquelet cardíac que aïlla elèctricament les aurícules dels ventricles i participen en el creixement dels miòcits i l'expansió de les cambres cardíaques durant el desenvolupament (35). La seva funció més coneguda és mantenir l'estructura i integritat del cor mitjançant la proliferació i el control de la matriu extracel·lular (<sup>36</sup>). Els fibroblasts, a més, exerceixen comunicacions cèl·lula-cèl·lula amb miòcits (27;37), altres fibroblasts (38), i cèl·lules endotelials (<sup>39</sup>). Fruit d'aquestes comunicacions els fibroblasts poden interferir en les propietats electrofisiològiques dels miòcits, regular l'expressió d'altres fibroblasts, i potenciar la formació de vasos sanguinis (40;41). Els fibroblasts del cor es disposen en paral·lel amb els miòcits de tal manera que mantenen la continuïtat amb cèl·lules de les diferents capes del miocardi (27). Aquesta disposició també permet una comunicació dinàmica i coordinada amb els miòcits i la matriu extracel·lular. En aquest entorn, els fibroblasts responen a una varietat d'estímuls mecànics, elèctrics i químics que són fonamentals per mantenir la funció cardíaca normal (42:43). Per tot això, el paper dels fibroblasts és decisiu tant en la regulació i manteniment de la funció cardíaca en estat normal, com durant els processos de remodelat en condicions patològiques com pot ser l'infart de miocardi i la hipertensió (44;45).

La població de fibroblasts no és constant en tot el teixit cardíac, la seva densitat i fenotip varia en funció de la regió del cor on estan situats i pot alterar-se en resposta a senyals fisiològiques (<sup>46-48</sup>). Les diferències que existeixen entre els fibroblasts de diferents regions del cor, es deuen a les propietats hemodinàmiques, neurohormonals

i estructurals específiques de cada cambra cardíaca (<sup>49;50</sup>). Segons aquestes característiques, els fibroblasts aïllats de les aurícules creixen més ràpidament en cultiu cel·lular i també presenten diferències en quant a l'organització, la morfologia i el perfil d'expressió gènica, en comparació amb els fibroblasts procedents dels ventricles (<sup>51</sup>). Aquestes diferències en el patró d'expressió de gens existeixen des del desenvolupament (<sup>52</sup>) i de fet, s'ha descrit que també succeeix durant el progrés de diferents estats patològics (<sup>53-55</sup>).

La densitat de fibroblasts del teixit miocardíac tendeix a augmentar amb l'edat de l'individu i durant la progressió de diferents estats patològics (<sup>27</sup>). En processos reparatius com el remodelat cardíac la població de fibroblasts augmenta a nivell local (Figura 7). Per exemple, s'ha observat que després d'un infart es produeix un augment considerable en la quantitat de fibroblasts i miofibroblasts presents en la proximitat del teixit cicatritzant (<sup>56;57</sup>).



Figura 7: Esquema representatiu de les accions que realitza un fibroblast durant els processos de remodelat i reparació

Els fibroblasts són morfològicament molt heterogenis, presenten diverses aparences segons la seva localització i la seva activitat (<sup>58</sup>). Així, segons la seva activitat es diferencien tres fenotips cel·lulars: fibròcits, fibroblasts i miofibroblasts. Els fibròcits són cèl·lules derivades del moll de l'os que circulen per la sang expressant marcadors de superfície de cèl·lules hematopoètiques. Tot i que són poc actives, poden produir proteïnes de la matriu extracel·lular (<sup>59;60</sup>). El fibròcit es pot convertir en fibroblast

quan la situació ho requereix (<sup>61;62</sup>). Els fibroblasts són el fenotip més comú, s'encarreguen de sintetitzar totes les fibres del teixit connectiu i tenen la capacitat de migrar i proliferar durant els processos de cicatrització de ferides (<sup>63</sup>). A més, durant els processos de cicatrització, els fibroblasts es poden diferenciar a miofibroblasts (<sup>64</sup>). Els miofibroblasts no són residents habituals en la majoria de teixits. Apareixen en situacions patològiques associades a una pèrdua de cèl·lules parenquimàtiques o quan té lloc una inflamació sense presència de necrosi, incloent la reparació tissular i la fibrosis intersticial progressiva. Aquest tipus cel·lular té una capacitat de síntesi i de proliferació major que els fibroblasts i es caracteritza per la expressió de cert tipus de miofibril·les pròpies de cèl·lules de la musculatura llisa.

#### 1.2. EFECTES DE L'EXERCICI SOBRE L'ESTRUCTURA I LA FUNCIÓ CARDÍACA

L'exercici físic augmenta el to simpàtic, la contractilitat del miocardi, la pressió ventricular i la freqüència cardíaca. L'augment de totes aquestes variables dóna lloc a l'augment del flux coronari necessari per cobrir l'increment en les demandes metabòliques.

La pràctica regular d'activitat física millora la resistència cardiovascular de qualsevol persona, independentment de l'edat i del nivell previ d'entrenament. Això, es relaciona amb una menor incidència d'esdeveniments coronaris greus i moderats (<sup>65-67</sup>). A més, es creu que la pràctica regular d'exercici ajuda a deixar de fumar (<sup>68</sup>), intervé en la millora de l'autoestima i l'estat d'ànim (<sup>69</sup>), redueix dependències en la gent gran (<sup>70</sup>) i disminueix potencialment la incidència d'alguns càncers (<sup>71;72</sup>). Hi ha tipus d'exercici que són més efectius que uns altres per millorar la salut del sistema cardiovascular. Generalment es recomana realitzar exercici aeròbic, com per exemple caminar, córrer, anar en bicicleta, esquiar o nedar (<sup>73</sup>). És a dir, qualsevol activitat que exerciti les grans masses musculars, ja que d'aquesta manera es produeix un augment en el consum cardíac i l'índex metabòlic.

Generalment, l'exercici provoca una sèrie de canvis adaptatius en l'organisme, en funció de com es duu a terme. És a dir, depenent del tipus d'exercici i de la intensitat, duració i periodicitat amb que es practica. Al mateix temps, totes aquestes variables estan influenciades per l'edat, la condició física de partida i les característiques intrínseques de cada individu. Els efectes biològics de l'adaptació a l'exercici es manifesten en diferents estructures del cos. En el múscul esquelètic s'observa una hipertròfia, un augment de la força i una major elasticitat dels lligaments. La massa corporal pateix una reducció del greix corporal i un augment de la musculatura. A
més en el sistema circulatori s'observa un augment en la quantitat d'hematies. No obstant, els canvis més importants són els que tenen lloc sobre els sistemes encarregats d'aportar oxigen a l'organisme, és a dir, l'aparell respiratori i el sistema cardiovascular.

#### 1.2.1. Tipus d'exercici

El terme exercici es pot definir com el moviment corporal repetitiu, estructurat i planejat que es realitza per a mantenir o millorar un o més aspectes de la forma física (<sup>74</sup>).

En funció de l'activitat muscular que impliqui, es considera l'existència de dos tipus d'exercici: el dinàmic o aeròbic i l'estàtic o anaeròbic (<sup>75</sup>). L'exercici dinàmic o aeròbic es defineix, com aquell que implica un gran nombre de músculs, provoca cicles d'estirament i escurçament de les fibres musculars i produeix una càrrega predictible i reproduïble sobre el sistema de transport d'oxigen en augmentar la demanda dels teixits perifèrics. Mentre que l'exercici estàtic o anaeròbic, normalment implica un menor nombre de músculs i no produeix una millora de la condició cardiovascular de l'esportista (<sup>74</sup>). La natació, córrer o el ciclisme són exemples clars d'exercici dinàmic o aeròbic, mentre que l'aixecament de peses ho és de l'exercici estàtic o anaeròbic. Els efectes hemodinàmics que es produeix un descens de la resistència perifèrica al flux circulatori i un augment tant en el volum cardíac com en la pressió sistòlica. Mentre que l'exercici estàtic o anaeròbic produeix un augment de la resistència perifèrica, de la pressió sistòlica i diastòlica i també un petit creixement en el volum cardíac (<sup>76</sup>).

Deixant de banda esports centrats principalment en la força com l'halterofília, la gran majoria de les modalitats esportives de competició impliquen una barreja entre l'esforç dinàmic o aeròbic i l'estàtic o anaeròbic. De fet l'aixecament de peses serveix de base per a qualsevol preparació física i modalitat esportiva. La intensitat de l'exercici i la durada són els paràmetres que determinen on es classifica un programa d'entrenament dins de l'ampli rang que existeix entre l'activitat lleugera-moderada i l'intensa-extenuant. A grans trets, es considera que una passejadeta diària de mitja hora és una activitat moderada i seguir un programa d'entrenament que permeti a un esportista classificar-se en una triatló és una activitat intensa (<sup>77;78</sup>).

#### 1.2.2. Processos fisiològics i d'adaptació a l'exercici

Totes les cèl·lules de l'organisme consumeixen energia per a mantenir la seva activitat vital en una situació de repòs. Amb l'exercici físic es produeix un augment important de les seves necessitats energètiques. Especialment, les cèl·lules de la musculatura cardíaca i esquelètica necessiten una aportació d'oxigen i energia molt elevada ja que són les que estan realitzant més treball. Per satisfer la demanda energètica es produeix la mobilització dels combustibles metabòlics emmagatzemats en diferents òrgans. Que la demanda muscular d'oxigen sigui satisfeta depèn del consum cardíac i del correcte funcionament dels sistemes respiratori i vascular. El consum cardíac es defineix com el volum de sang per minut que surt d'un ventricle. És a dir que és el resultat de multiplicar el volum sistòlic (o volum de sang que és ejectat per cada ventricle durant la contracció) per la freqüència cardíaca (número de batecs per minut). Després d'algunes setmanes d'entrenament qualsevol individu saludable augmenta el seu consum cardíac màxim i per conseqüent millora l'oferta distal d'oxigen als teixits. Aquest increment en l'oferta d'oxigen té lloc gràcies a que la musculatura desenvolupa noves xarxes capil·lars en resposta a l'entrenament.

Els canvis que tenen lloc en el sistema cardiovascular com a conseqüència de la pràctica esportiva estan dirigits a suplir unes necessitats d'energia superiors a les habituals. Per aconseguir-ho es produeix un augment del flux sanguini. De manera puntual, aquest augment s'aconsegueix mitjançant la vasodilatació dels vasos sanguinis. I quan és una situació que succeeix freqüentment, l'organisme s'hi adapta incrementant el diàmetre dels vasos (79). De tots els canvis que pot sofrir el sistema cardiovascular degut a l'exercici, el més habitual i destacable és l'hipertròfia del múscul cardíac. Es coneix com a hipertròfia el desenvolupament excessiu d'un òrgan, o d'una part d'un òrgan. El cor s'hipertrofia perquè els miòcits augmenten de mida. En funció de si els miòcits creixen incrementant la seva longitud o el seu diàmetre, es produirà un increment en el diàmetre de les cavitats del cor, en el gruix de les seves parets, o ambdós alhora. Es coneix com a cor d'atleta l'hipertròfia cardíaca produïda per l'exercici físic i generalment es caracteritza per tenir incrementats tant el diàmetre de les cavitats com el gruix de les parets. Com a conseqüència d'aquesta hipertròfia, durant la realització d'una activitat física intensa, un individu entrenat pot aconseguir una expulsió de sang igual al doble de la d'un individu sedentari. Això es deu en part al major diàmetre de les cavitats, que d'aquesta forma poden encabir més quantitat de sang, i en part a l'augment en el gruix de les parets del ventricle esquerre que li confereix una major força de contracció. Encara que el cor d'atleta és més gran i té la capacitat de bombar més sang en cada batec, en repòs, el seu consum cardíac és el

mateix que el d'un individu sedentari. El que passa, és que tot i que augmenta el volum sistòlic, disminueix la freqüència cardíaca basal. La disminució de la freqüència cardíaca en repòs és un altra característica típica de l'adaptació a l'exercici. En esportistes d'elit com ciclistes i atletes, la freqüència cardíaca mesurada en repòs acostuma a ser entre 40 i 60 batecs per minut. Mentre que en individus sedentàris els valors normals estan entre 70 i 80 batecs per minut.

La síndrome de cor d'atleta comprèn la remodelació morfològica i l'elèctrica que es produeix en major o menor mesura depenent de la disciplina esportiva. Els diferents tipus d'exercici estableixen diferents patrons d'hipertròfia. D'aquesta manera, un esportista que practica predominantment exercici dinàmic o aeròbic, presenta un patró d'hipertròfia caracteritzat per un petit increment del gruix de les parets miocardíagues, acompanyat d'un increment notable en el diàmetre de les cavitats. L'explicació d'aquesta adaptació és que l'exercici dinàmic o aeròbic fa que tota la musculatura del cos necessiti una aportació d'oxigen elevada. És a dir, que necessita agilitzar el moviment de la sang perquè arribi de pressa a tot arreu. En consegüència, augmenta el retorn venós i es produeix una sobrecarrega de volum als ventricles. Els ventricles s'adapten a aquesta sobrecàrrega incrementant el diàmetre de les seves cavitats i això s'aconsegueix per mitjà del creixement longitudinal dels miòcits. Aquest tipus de hipertròfia és coneix com hipertròfia excèntrica. En canvi durant l'exercici estàtic o anaerobi, l'augment del treball cardíac és per sobrecàrrega de pressió. En aquest cas el consum cardíac no s'altera. La sobrecàrrega de pressió determina un gran augment en el gruix de les parets. De manera que la relació paret/diàmetre de la cavitat s'acaba modificant ja que el diàmetre de les cavitats no acostuma a augmentar. Aquesta adaptació es produeix mitjançant l'increment transversal en la mida dels miòcits i la hipertròfia generada és coneix com hipertròfia concèntrica.

Com que la majoria d'entrenaments esportius consisteixen en una combinació de pràctica aeròbica i anaeròbia el cor d'atleta és una barreja entre els dos tipus d'hipertròfia cardíaca. Fins ara, totes aquestes adaptacions a l'esport han estat considerades canvis fisiològics (<sup>80-82</sup>), més beneficioses que perjudicials (<sup>83;84</sup>) i de caràcter reversible (<sup>82;85</sup>). De totes maneres, des d'un punt de vista fisiològic, tot tipus d'exercici suposa un cert nivell d'estrès per a l'organisme. En aquest sentit, diversos estudis han descrit que s'observa la presència o increment de marcadors de dany cardíac en el plasma d'esportistes poc després de competir en esdeveniments esportius com carreres de maratons, triatlons, o curses ciclistes (<sup>86;87</sup>). A més aquesta presència de marcadors de dany cardíac ha estat observada tant en atletes d'elit com

en atletes recreatius i ha estat associada directament a la pràctica d'exercici (88;89). En la pràctica clínica la presència en sang de nivells elevats de proteïnes com les troponines cardíagues (cTnT i cTnI), o pèptids com el pèptid natriurètic tipus B (PNB), serveixen per pronosticar malalties com la síndrome coronaria aguda, la disfunció cardíaca o l'infart (90;91). Es considera que en absència d'evidències clíniques d'isquèmia, un valor elevat de les troponines cardíaques hauria d'impulsar la recerca d'altres etiologies, com per exemple l'esforç extrem (92). En aquest sentit, hi ha un gran nombre d'estudis clínics que demostren que l'exercici pot provocar un increment de cTnT o cTnI en individus saludables (49;93-97). Aquests increments, han estat mesurats en atletes just després de participar en esdeveniments com les maratons (<sup>88;98;99</sup>), i a més, s'han correlacionat amb canvis en la funció cardíaca, particularment en el ventricle dret (<sup>14;100</sup>). La presència de nivells elevats de PNB en sang, s'associa a patologies com la disfunció cardíaca, la insuficiència crònica, les cardiomiopaties i els síndromes coronaris aguts. Igual que passa amb les troponines, diversos estudis han observat un increment en les quantitats de PNB en sang d'esportistes després d'una pràctica d'exercici intensa (<sup>13;87;88;101-103</sup>). Aquests increments, per ara no s'han considerat un factor alarmant, ja que disminueixen significativament en un breu període de temps, contràriament al que passa amb els individus malalts (101;103-106). De fet, es creu que podrien tenir un efecte cardioprotector o de regulació durant el procés de formació del cor d'atleta. Tot i això, no existeix cap consens respecte la seva presència o increment després de la realització d'exercici prolongat, ja que en realitat no es coneix si representen una agressió semblant a la que es dóna en estats patològics.

#### 1.3. FISIOPATOLOGIA DE L'HIPERTRÒFIA I DE LA FIBROSI CARDÍACA

Seguint les demandes metabòliques de l'organisme, el teixit cardíac s'estira i es contrau amb la finalitat d'aconseguir la perfusió adequada dels diferents teixits del cos. El rendiment d'aquest procés depèn de tres factors: la precàrrega, la contractilitat i la postcàrrega (<sup>107</sup>).

La precàrrega és el grau d'estirament de les fibres del cor abans de començar a contraure's. Dins de certs límits, el funcionament de la precàrrega és el següent: a major volum de sang durant la diàstole, major és la força de contracció durant la sístole. Aquesta relació s'anomena llei de Frank-Starling. Els principals factors que determinen el volum sanguini són, per una banda, la durada de la diàstole ventricular i per l'altra el retorn venós, o volum de sang que retorna a cada ventricle. És a dir, quan hi ha una fregüència cardíaca major, les diàstoles són més curtes i s'obté un

volum menor al final d'aquesta. Per altre banda, com més quantitat de sang retorna, més volum de sang entra als ventricles i major és el volum al final de la diàstole.

La contractilitat és la força de contracció del múscul i depèn de factors inotròpics positius que la incrementen i factors inotròpics negatius que la disminueixen. Formen part dels agents inotròpics positius les hormones com l'adrenalina i la noradrenalina, perquè afavoreixen l'entrada de calci al miòcit, i per tant, augmenten la força de la contracció. Per contra, la inhibició de la via simpàtica, es pot donar per anòxia, acidosis, anestèsics, increments en els nivells de potassi intersticial, bloquejadors dels canals de calci, etcètera, i actua com a agent inotròpic negatiu. Finalment, la postcàrrega és la pressió que ha de superar la sang per aconseguir fluir per les artèries. Un augment en la poscàrrega causa una disminució en el volum sistòlic, quedant més quantitat de sang en el ventricle.

Durant la progressió de la majoria de les malalties cardiovasculars es produeixen alteracions en algun d'aquests factors. Per exemple; en la insuficiència cardíaca o les valvulopatíes, es modifiquen les condicions de precàrrega, de manera que canvien les condicions d'emplenament i pressió dels ventricles. Tant la contractilitat com la capacitat de distensió de les fibres cardíaques estan alterades en les cardiomiopaties i patologies com la hipertensió i l'arteriosclerosi augmenten la post càrrega. En general, aquestes situacions estan relacionades amb processos de remodelat tissular. El remodelat tissular engloba el conjunt de canvis elèctrics, iònics, moleculars i estructurals que es donen al miocardi com a resposta a un estímul advers, en funció del temps, en l'intent d'adaptar-se i recuperar l'homeòstasi. El tipus i l'extensió del remodelat variarà segons el temps d'exposició i la classe d'estrès que rebi el múscul cardíac.

L'hipertrofia cardíaca és el mecanisme d'adaptació que utilitza el cor per ajustar la seva massa a la càrrega hemodinàmica. L'hipertròfia cardíaca es pot classificar entre fisiològica o patològica. En aquest sentit, l'exemple més típic d'hipertròfia fisiològica és el fenomen d'adaptació a l'exercici conegut com a cor d'atleta (<sup>82;108</sup>). En aquest cas, la hipertròfia cardíaca, es caracteritza per seguir mantenint la proporció de tots els components del miocardi com la matriu extracel·lular i els vasos sanguinis (<sup>82</sup>). Un altre característica pròpia de la hipertròfia fisiològica és la capacitat de reversió un cop ha desaparegut l'estímul (<sup>85</sup>). En canvi, en l'hipertròfia patològica es produeix una marcada alteració en la ultraestructura del miocardi, que afecta, tant als miòcits com als components de la matriu extracel·lular i les cèl·lules de l'interstici (<sup>109</sup>). L'alteració de l'equilibri entre la matriu extracel·lular i el miòcit, implica que es produiran canvis,

no només en la composició de la matriu, sinó també en l'orientació de les fibres, els components intracel·lulars i la composició cel·lular. En conseqüència, aquesta sèrie de canvis poden pertorbar la capacitat de distensió del miocardi i la funció sistòlica.

Generalment, quan es produeix una lesió, es posen en marxa un seguit de mecanismes que donaran lloc a una resposta inflamatòria i a la posterior reparació del teixit. Quan la lesió és petita, la reparació dóna lloc a una reestructuració normal de la funció del teixit. En canvi, quan la lesió és intensa o bé repetitiva pot donar lloc a que es desenvolupi la formació de fibrosi. Es coneix com a fibrosi el procés reparatiu caracteritzat per una acumulació excessiva de fibroblasts. Aquests, actuen sintetitzant i dipositant proteïnes de la matriu extracel·lular de manera descontrolada. Per tant, la fibrosi comporta una acumulació exagerada de teixit intersticial, i en conseqüència, es distorsiona l'arquitectura normal del teixit.

La presència de fibrosi cardíaca demostra l'existència de remodelat estructural i afavoreix l'aparició i el manteniment d'arítmies (110;111). Alhora, l'aparició d'arítmies facilita el remodelat elèctric. Fins ara, la fibrosi ventricular sempre ha rebut una gran atenció. Els primers estudis ja van descriure que el desenvolupament de fibrosi en les parets ventriculars comporta un increment progressiu en la seva rigidesa i generalment acaba resultant en disfunció ventricular i insuficiència cardíaca congestiva (<sup>109</sup>). No obstant, els resultats derivats d'estudis posteriors indiquen que també existeix una associació entre la fibrosi auricular i la insuficiència cardíaca congestiva, i a més constaten la seva implicació tant en els defectes valvulars, com en l'hipertensió i l'envelliment (<sup>112</sup>). La fibrosi auricular ha estat associada amb el desenvolupament de malalties del cor i arítmies, incloent la insuficiència cardíaca congestiva i la fibril·lació auricular. L'aparició de fibril·lació auricular com a conseqüència del desenvolupament de fibrosi a l'aurícula, recentment ha estat objecte d'una intensa investigació, ja que és l'arítmia més present en individus adults i incrementa el risc de mort prematura. Els desencadenants més comuns tant per la fibrosi ventricular com per l'auricular (Figura 8) inclouen l'activació del sistema reninaangiotensina (<sup>109;113</sup>), l'inflamació i l'estrès oxidatiu (<sup>114;115</sup>).



Figura 8: Representació esquemàtica de les principals vies relacionades amb el desenvolupament de fibrosi cardíaca.

Generalment, els processos de remodelat per fibrosi són el resultat d'una reparació anormal de la lesió. La seqüència d'esdeveniments que es produeixen durant el desenvolupament de la fibrosi en el miocardi és semblant a la que es pot observar en altres òrgans on la formació de cicatrius condueix a una disfunció del teixit, independentment de la naturalesa del dany i de l'òrgan afectat (<sup>116</sup>). Com a conseqüència d'una lesió, les cèl·lules inflamatòries i els fibroblasts alliberen al medi citocines i factors de creixement. Els fibroblasts responen a aquestes senyals migrant al lloc d'acció i degradant l'estructura fibril·lar del col·lagen, mitjançant l'expressió de metal·loproteinases. Això permet la migració i proliferació de més cèl·lules a la zona de la lesió per repoblar els espais buits que van deixant els miòcits necròtics i eliminar les restes cel·lulars (<sup>117,118</sup>). Quan les lesions són grans o bé molt freqüents, es trenca l'equilibri habitual entre miòcits, fibroblasts i matriu extracel·lular i s'inicia un procés de remodelat estructural (Figura 9). En aquests processos, els fibroblasts diferenciats a miofibroblasts juguen un paper clau ja que tenen una major capacitat de síntesi i participen activament en la deposició de col·lagen i la formació de



cicatrius. Tot això distorsiona la composició de la matriu, i pot afectar la funció cardíaca.

Figura 9: Comunicació entre miòcits, fibroblasts i matriu extracel·lular durant una situació de sobrecàrrega de pressió. Ang-II: Angiotensina-II. TGF- $\beta$ 1: factor de creixement transformant beta (TGF- $\beta$ ). MMPs: Metal·loproteïnases. TIMPs: Inhibidors tissulars de les metal·loproteïnases. ECM: Matriu extracel·lular.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, qualsevol tipus d'exercici suposa un cert nivell d'estrès per a l'organisme. Gairebé sempre, aquest estrès és mínim i no comporta cap tipus de repercussió. Ara bé, quan el nivell d'estrès al que es sotmet el cor és més elevat, degut a la modalitat d'exercici practicada, la intensitat o el temps de duració de l'activitat, existeix la possibilitat d'ocasionar un cert grau de dany cardíac. Si l'excés d'exercici pot ocasionar alguna mena de lesió en el teixit cardíac, la suma de moltes lesions podria desencadenar un procés de remodelat per fibrosi. De fet aquesta possibilitat és la hipòtesis sobre la qual s'ha desenvolupat aquest treball d'investigació.

# 1.3.1. Paper del sistema Renina-Angiotensina en la fibrosis cardíaca

L'Angiotensina-II és la molècula efectora del sistema renina-angiotensina. A nivell sistèmic, aquesta hormona juga un paper molt important regulant la pressió i el volum sanguini. La renina és un enzim que es produeix als ronyons i catalitza la conversió de l'angiotensinogen, produït al fetge, a angiotensina-I. Posteriorment, l'enzim

convertidor d'angiotensina (ACE-1) trencarà per proteòlisi l'angiotensina I en l'octapèptid angiotensina-II. Alternativament a l'expressió del sistema reninaangiotensina a nivell sistèmic, la seva expressió local en el teixit miocardíac, juga un paper molt important en la regulació de la funció cardíaca, influint en el to vascular, mitjançant l'equilibri de líquids i electròlits (<sup>119</sup>). En aquest sentit, nombrosos estudis han demostrat que la sobrecàrrega hemodinàmica activa el sistema reninaangiotensina del cor (<sup>120;121</sup>). De fet, s'ha descrit que durant el transcurs d'estats patològics caracteritzats pel remodelat cardíac, els nivells de angiotensina-II es troben incrementats en el miocardi (<sup>122</sup>).

Els resultats obtinguts en diversos estudis experimentals indiquen que el sistema renina-angiotensina local provoca tant la proliferació de fibroblasts com l'hipertròfia dels miòcits (123;124). Per tant, l'angiotensina-II com a hormona efectora d'aquest sistema juga un paper molt important en el desenvolupament de fibrosi cardíaca. L'angiotensina-II indueix l'estimulació de factors de creixement i citocines (125-127) i estimula la diferenciació de fibroblasts a miofibroblasts (128-131). Els efectes de angiotensina-II es produeixen mitjançant dos subtipus de receptors, coneguts com AT1 i AT2, que es troben presents en els miòcits, els fibroblasts i les cèl·lules del teixit muscular llis present en els vasos sanguinis (132). La majoria dels efectes que s'observen durant la fibrogènesi cardíaca es produeixen mitjançant el receptor AT1 (<sup>133</sup>). Per exemple, mitjançant aquest receptor, l'angiotensina-II indueix la síntesi desmesurada de proteïnes de la matriu extracel·lular i promou el desequilibri entre les activitats de les metaloproteïnases i dels seus inhibidors tissulars (TIMPs). Concretament, quan l'angiotensina-II entra en contacte amb el receptor AT1 dels fibroblasts estimula la síntesis de col·lagen I, col·lagen III i fibronectina (<sup>134;135</sup>). De fet, l'angiotensina-II indueix la secreció de moltes altres molècules importants per la regulació de les funcions cel·lulars, com per exemple el TGF-β (<sup>136;137</sup>), el factor de necrosi tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (<sup>138;139</sup>), la interleuguina-6 (IL-6) (<sup>140</sup>), l'endotelina-1 (ET-1) (<sup>141;142</sup>), el PNB (<sup>143-145</sup>) i el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) (<sup>146</sup>).

#### 1.3.2. Factors de creixement, enzims i proteïnes de la matriu extracel·lular

Durant la progressió de processos com el remodelat i la fibrosi tenen lloc un seguit de canvis en la expressió de citocines i enzims que afavoreixen la desestabilització de l'arquitectura normal del teixit. La quantitat de factors de creixement com el TGF- $\beta$  i la relació de proteïnes de matriu extracel·lular com la fibronectina, els col·làgens, els enzims que degraden la matriu extracel·lular i els seus inhibidors que hi ha en el teixit, varien durant el desenvolupament i en estats patològics com la fibrosi.

#### 1.3.2.1. TGF- β1

El TGF- β1 és una citocina profibròtica de la superfamília del TGF-β. Els membres d'aquesta superfamília participen en els processos de proliferació, diferenciació, motilitat, estat d'activació i apoptosi d'una àmplia varietat de tipus cel·lulars (<sup>147</sup>). Aquest factor de creixement es troba arreu de l'organisme i és sintetitzat per diversos tipus cel·lulars, incloent fibroblasts, cèl·lules del teixit muscular llis, cèl·lules endotelials, macròfags i miòcits (<sup>148-150</sup>). S'allibera al medi com a complex inactiu format per la proteïna activa, un pèptid associat a la latència i un pèptid senyal. La seva forma activa esta constituïda per dímers de 25 kDa, que en condicions reductores generen monòmers de 12.5 kDa.

El TGF- $\beta$ 1 juga un paper diferent en la diferenciació dels miòcits cardíacs i en la diferenciació dels miòcits del múscul esquelètic (<sup>151</sup>). En el teixit cardíac, el TGF- $\beta$ 1 indueix i regula la diferenciació de cèl·lules mare a miòcits i participa en l'angiogènesi (<sup>152</sup>). La principal font de TGF- $\beta$ 1 en el teixit cardíac són els fibroblasts (<sup>152</sup>). La seva sobre-expressió, resulta en l'aparició de fibrosi, degut a que estimula la migració de neutròfils, monòcits i fibroblasts a la zona lesionada. El seus efectes sobre els fibroblasts inclouen l'increment en la síntesis de col·làgens fibril·lars, fibronectina i proteoglicans (<sup>153-155</sup>), a més d'afavorir la seva diferenciació a miofibroblasts (<sup>156</sup>). Per tant, el TGF- $\beta$ 1 es pot considerar un potent estimulador de la síntesi i la deposició de proteïnes de la matriu extracel·lular. La seva sobre-expressió es relaciona amb patologies com la hipertròfia, la dilatació i la isquèmia (<sup>157</sup>). En aquest sentit hi ha diversos estudis experimentals que han relacionat el TGF- $\beta$ 1 amb el desenvolupament de fibrosi cardíaca (<sup>158-160</sup>).

L'existència d'estudis dedicats a l'avaluació de l'expressió del TGF-β1 en resposta a l'exercici físic és molt escassa. No obstant, un estudi clínic descriu que l'exercici intens incrementa els nivells de TGF-β1 en sang (<sup>161</sup>). Malauradament, els resultats obtinguts en aquest estudi no permeten concloure que la procedència d'aquests increments tingui l'origen en una lesió cardíaca. Per altre banda, un estudi experimental realitzat amb un model de rates que van córrer voluntàriament sobre rodes, va observar increments en l'expressió de TGF-β1 en el teixit cardíac. Aquest estudi, a més, va correlacionar l'increment d'expressió amb la intensitat de l'exercici realitzat (<sup>162</sup>).

#### 1.3.2..2. Fibronectina-1

La fibronectina-1 és una glicoproteïna formada per una molècula asimètrica que consisteix en dues subunitats similars de 220 kDa, unides per ponts disulfur a prop de la seva regió carboxi terminal. Tot i que existeixen moltes isoformes de fibronectina, es poden diferenciar dos tipus segons es presenti de forma soluble o insoluble. La fibronectina soluble, es troba en el plasma i en els fluids amniòtic, seminal, cerebroespinal i articular formant dímers. La seva forma insoluble es troba en les estructures fibril·lars de la matriu extracel·lular i en les membranes basals de la majoria de teixits, formant complexos d'alt pes molecular units per enllaços covalents (<sup>163-165</sup>). Tot i que hi ha diversos tipus cel·lulars amb capacitat per sintetitzar i secretar fibronectina, la font principal de la fibronectina circulant són els hepatòcits, mentre que els principals secretors de la fibronectina-1 insoluble són els fibroblast i les cèl·lules endotelials (<sup>163;166</sup>).

La fibronectina-1 és una proteïna present a la matriu extracel·lular de la majoria dels teixits del cos, per tant, és un dels components de major distribució en l'organisme. Aquesta proteïna ha estat amplament estudiada per la seva capacitat d'interactuar amb diverses cèl·lules i macromolècules, a més, influeix en el comportament cel·lular i intervé en una gran varietat de processos fisiològics com la fagocitosi, la proliferació, l'adhesió i la migració cel·lular. La fibronectina-1 es pot unir a col·lagen, fibrinogen, fibrina, etcètera. Aquestes unions ajuden a estabilitzar la matriu extracel·lular i són de gran utilitat en processos com l'adhesió i la migració cel·lular (167;168). Addicionalment, la presència de fibronectina-1 es troba incrementada durant la cicatrització d'una lesió. En aguest sentit, s'ha observat un augment en la seva expressió en diferents patologies que cursen amb un procés de remodelat, cosa que afavoreix al desenvolupament de fibrosi (<sup>169;170</sup>). En el teixit cardíac, durant el desenvolupament i en estats patològics, la expressió de fibronectina-1 sovint ve precedida per un increment en l'expressió de col·lagen i de TGF-B1 (<sup>171</sup>). Per un altre banda, alguns estudis han demostrat que immediatament després d'una sessió d'exercici els nivells de fibronectina-1 en plasma es troben significativament elevats (172;173).

1.3.2.3. MMPs

Les MMPs són una família d'enzims proteolítics dependents de Zinc que s'encarreguen del remodelat de la matriu extracel·lular. En conjunt les MMPs poden degradar tots els components de la matriu extracel·lular (<sup>174;175</sup>).

Hi ha dos tipus de MMPs; les que són secretades a l'espai intercel·lular com a proenzims en estat latent, que constitueixen la majoria de les MMPs conegudes, i les que estan unides a membrana (<sup>174</sup>). En tot cas, les MMPs requereixen ser activades per poder dur a terme la seva funció i estan regulades a nivell transcripcional; en el moment de la seva activació; i per els TIMPs (<sup>176</sup>). Seguint el criteri del substrat sobre el que actuen específicament, aquesta família d'enzims es pot classificar entre les següents sis subfamílies: col·lagenases, gelatinases, estromalisines, matrisilina, MMPs de membrana i altres MMPs. Fins ara s'han identificat més de 20 membres per a la família de les MMPs.

Indubtablement, les MMPs juguen un paper molt important en el manteniment tant de l'arquitectura com de la funció cardíaca normal. Hi ha estudis que evidencien que l'activitat de les MMPs pot canviar la estructura de la matriu extracel·lular del teixit cardíac, cosa que comporta una pèrdua de la contractilitat (<sup>177</sup>). De fet, els increments en la seva expressió s'associen amb la progressió d'estats patològics. També, s'ha descrit que la seva activació prolongada suposa una excessiva degradació de la matriu extracel·lular i en conseqüència es pot produir una reparació anormal del teixit (<sup>178</sup>).

Tot i que les MMPs i els TIMPs són expressats per la majoria de cèl·lules del cor, la font principal són els fibroblasts (<sup>179</sup>). Els fibroblasts cardíacs expressen un subconjunt limitat de MMPs, entre les quals es troba les col·lagenases MMP-1 i MMP-13 (<sup>180;181</sup>), les gelatinases MMP-2 i MMP-9 (<sup>182</sup>), l'estromalisina MMP-3 (<sup>183</sup>) i MMPs unides a membrana, predominantment MT1-MMP (<sup>184</sup>). Hi ha una gran varietat d'estímuls químics, físics i ambientals que modulen l'expressió i l'activació de les MMPs. Per exemple, els processos de anòxia i re-oxigenació, la càrrega mecànica, la presència de citocines inflamatòries, hormones, etcètera.

Les MMPs que han estat més estudiades en diferents malalties humanes són les gelatinases. Hi ha moltes evidències que indiquen que les gelatinases MMP2 i MMP9 participen en el desenvolupament de malalties intersticials. Per aquest motiu, han estat el blanc de molts estudis centrats en la remodelació cardíaca associada a estats patològics. Ambdues gelatinases contenen un domini estructural tipus II de fibronectina dins del seu domini catalític, que resulta ser de gran afinitat a la gelatina i la elastina. La MMP-2 degrada un extens rang de proteïnes de la matriu extracel·lular, és efectiva principalment amb el col·lagen tipus IV i altres components de les membranes basals, encara que també té la capacitat de degradar col·làgens fibril·lars (<sup>185</sup>). La MMP-2 és secretada constitutivament pels fibroblasts cardíacs en cultiu (<sup>186</sup>),

encara que la seva expressió és potenciada per citocines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) (<sup>187</sup>), BNP (<sup>188</sup>), per l'estrès oxidatiu (<sup>189</sup>) i la sobrecàrrega mecànica (<sup>190</sup>).

Hi ha diversos estudis que suggereixen que nivells elevats de MMP-2 en plasma estan relacionats i podrien ser un factor de pronòstic de fallida cardíaca (<sup>177</sup>). L'efecte de l'exercici sobre els nivells en plasma de les gelatinases ha estat avaluat en dos estudis clínics (<sup>191;192</sup>). Aquests dos estudis, van obtenir diferents resultats i van arribar a unes conclusions oposades. És important ressaltar que ja presentaven diferències importants en el seu plantejament. Un es va realitzar amb individus prèviament desentrenats i avaluava l'efecte agut de l'exercici intens. L'altre estava dirigit a estudiar la relació entre els nivells de les gelatinases i el cor d'atleta. Els resultat obtinguts en el primer estudi relacionen l'exercici amb l'activació de les MMPs. En canvi, l'altre estudi obté que els individus amb cor d'atleta experimenten un detriment en els nivells de MMP-2 i MMP-9. Les diferències en quant els resultats obtinguts en el se podrien explicar per les diferències en el plantejament dels objectius i a les diferències en la metodologia, ja que el moment en que es van recollir les mostres i el mètode de determinació van ser diferents.

#### 1.3.2.4. TIMPs

El control de l'activitat de les MMPs en part està regulat pels membres d'una família d'inhibidors específics, coneguts com els TIMPs. Aquests, influeixen sobre l'activació de les pro-MMPs i modulen la proteòlisi de la matriu extracel·lular durant els processos de remodelat tissular i inflamació. Els TIMPs són proteïnes sintetitzades i secretades localment que actuen mitjançant la unió no covalent i reversible amb les MMPs en una relació 1:1 (<sup>193;194</sup>). Existeixen 4 membres d'aquesta família, que tenen en comú l'acció d'inhibir totes les MMPs amb major o menor afinitat (<sup>195</sup>).

A part d'inhibir les MMPs, mitjançant el seu domini N-terminal, els TIMPS, duen a terme altres funcions. Per exemple, actuen com a factors de creixement en diversos tipus cel·lulars i regulen l'apoptosi (TIMP-1 i TIMP-2 l'inhibeixen, mentre que TIMP-3 l'afavoreix) (<sup>194-196</sup>). En el teixit cardíac normal les MMPs i TIMPs són co-expressats i estretament regulats per tal de mantenir la integritat del interstici (<sup>197</sup>). Per tant, l'equilibri MMP/TIMP és molt important en el recanvi de les proteïnes de la matriu i el seu desequilibri juga un paper clau en els processos de remodelat. Diferents estudis clínics han demostrat que en la fallida cardíaca l'activitat de les MMPs es troba incrementada i la dels TIMPs reduïda (<sup>198</sup>). Es creu que quan es pertorba l'equilibri entre MMPs i TIMPs, ja sigui per un increment en l'expressió de MMPs o per una

baixada en l'expressió dels TIMPs, es potencia la formació de fibrosi (<sup>199</sup>). Hi ha estudis que correlacionen una baixada en l'expressió de TIMP-1 i TIMP-2 amb la aparició de fibril·lació auricular i la dilatació del ventricle dret (<sup>194;200</sup>).

Els fibroblasts cardíacs són la font principal dels TIMPs que es troben en el miocardi, i les isoformes que expressen són predominantment els TIMP-1 i TIMP-2 (<sup>201</sup>). Tal i com passa amb les MMPs, el seu nivell d'expressió varia segons els estímuls microambientals (<sup>202;203</sup>). Així, en diferents malalties cardíaques com en la fibril·lació auricular (<sup>204;205</sup>) i durant el deteriorament de la fallida cardíaca (<sup>202</sup>) s'ha observat que es produeix un increment en l'expressió d'aquest inhibidor, de la mateixa manera també ha estat observat un increment en la concentració de TIMP-1 en el plasma d'atletes veterans (<sup>203</sup>).

# 1.3.2.5. Col·làgens fibril·lars tipus I i tipus III

Els col·làgens són un grup de proteïnes molt nombrós i divers, originades a partir de la polimerització de tropocol·lagen i es caracteritzen per formar fibres. Les fibres de col·lagen es troben a tots els organismes del regne animal formant part de l'estructura de la matriu extracel·lular i dels cartílags i són secretades per cèl·lules del teixit conjuntiu, principalment pels fibroblasts.

Existeixen molts tipus de col·lagen. En el teixit cardíac, formant la matriu extracel·lular, es troben principalment col·lagen tipus I i col·lagen tipus III. Aquests ajuden a mantenir la integritat estructural del teixit del miocardi i col·laboren en la conversió de l'escurçament dels miòcits en el moviment de bombar. En estat normal, la deposició de col·lagen en el cor és baixa. En canvi en estats patològics com la hipertròfia, el infart de miocardi i la fallida cardíaca aquesta deposició s'incrementa considerablement (<sup>206</sup>).

El col·lagen de tipus I difereix del col·lagen de tipus III en el diàmetre de la seva fibra, essent el col·lagen tipus I més gruixut i resistent, i el col·lagen tipus III més prim i elàstic. Segons aquestes propietats, la funció principal del col·lagen tipus I és donar resistència a l'estirament i la del col·lagen de tipus III és proporcionar elasticitat al teixit. Tant el desequilibri en les proporcions normals d'aquests col·làgens com la seva acumulació exagerada són esdeveniments típics de diferents patologies cardíaques. Un increment en les proporcions de col·lagen de tipus I esta associat amb un increment remarcable en la rigidesa del teixit. Aquesta situació on la relació col·lagen tipus I/ tipus III es decanta cap a un increment, es dóna en les aurícules de

pacients amb fibril·lació auricular i està correlacionat amb la durada, la freqüència i la recurrència dels episodis d'aquesta arítmia (<sup>207</sup>). En canvi, en el teixit ventricular de pacients amb fallida cardíaca, es dóna un increment en el col·lagen tipus III i per tant una reducció en el valor de la relació col·lagen tipus I/ tipus III (<sup>208</sup>). En aquests casos en que el teixit és més lax i flexible, les cavitats del cor no tenen problemes per encabir el volum de sang però perden la capacitat per expulsar-la.

Hi ha un estudi que evidencia que l'exercici promou la disrupció de l'equilibri entre la síntesi i la degradació del col·lagen. Aquest estudi documenta un augment dels pèptids marcadors de la síntesi i la degradació de col·lagen en sang en individus que han practicat exercici intens i tenen hipertròfia cardíaca (<sup>203</sup>). En aquest mateix sentit, els resultats obtinguts en un estudi realitzat amb un model animal també va demostrar que l'exercici pot incrementar la síntesi de col·lagen en algunes regions del cor (<sup>209</sup>).

#### 1.4. MODELS ANIMALS

Existeixen un gran nombre de models animals amb els quals s'han pogut caracteritzar molts dels mecanismes involucrats en el desenvolupament de la fibrosi cardíaca. Per exemple en models de malalties cardíaques com l'infart de miocardi (<sup>210</sup>), l'hipertensió (<sup>211</sup>), l'insuficiència crònica (<sup>212</sup>) i diverses arítmies (<sup>213;214</sup>). En la major part d'aquests models animals s'aconsegueixen provocar les diferents patologies per mitjà de cirurgia, via administració de fàrmacs, estimulacions elèctriques controlades, dietes riques en sal o utilitzant animals espontàniament hipertensos, *knock-down*, etcètera. D'aquesta manera és possible alterar les condicions hemodinàmiques del cor o el seu ritme segons la patologia a estudiar. Sovint aquests models experimentals es realitzen amb animals grans com per exemple gossos, cabres o porcs (<sup>215;216</sup>). Els animals més petits com la rata, el ratolí i el conill també són utilitzats, sobretot per a estudiar malalties cròniques, i mecanismes moleculars (<sup>217;218</sup>).

En quant a l'existència de models animals que serveixin per a estudiar els efectes fisiològics de l'exercici sobre el cor o el funcionament cardiovascular, també es troba una ampla varietat. En la majoria dels casos, però, els protocols d'entrenament realitzats són de caràcter suau o moderat. Clàssicament aquests protocols s'han desenvolupat per estudiar l'efecte del exercici en la recuperació d'un infart (<sup>219;220</sup>), en la fallida cardíaca (<sup>221;222</sup>), o en l'hipertensió (<sup>223;224</sup>). Els diferents protocols d'exercici que existeixen, inclouen diferents modalitats d'exercici, així com la voluntarietat o no

alhora de la seva realització. Per a animals petits com les rates, hi ha models de córrer voluntàriament sobre una roda (<sup>225;226</sup>), de córrer sobre una cinta rodant motoritzada (<sup>222;227</sup>), de natació (<sup>224;227;228</sup>), i fins i tot d'aixecament de pesos (<sup>229;230</sup>). Actualment existeixen molts pocs estudis amb models animals que s'hagin dedicat a investigar els efectes adversos d'un excés d'exercici sobre el teixit miocardíac (<sup>231</sup>). Per quest motiu, aquest treball s'ha centrat en el disseny d'un model animal per l'estudi dels efectes crònics sobre el teixit cardíac induït per la pràctica d'exercici intens i continuat en el temps.

# OBJECTIUS

# 2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta Tesi ha estat establir un model animal que permeti reproduir els fenòmens que tenen lloc durant el desenvolupament de fibrosi cardíaca induïda per la practica d'exercici intens i continuat. Avaluar els mecanismes implicats.

Aquest objectiu general es va desglossar en els següents tres objectius concrets:

**Objectiu 1:** Determinar el temps d'exercici necessari per desencadenar un procés de remodelat cardíac per fibrosi. Avaluar si la fibrosis cardíaca induïda per exercici facilita l'aparició d'arítmies.

**Objectiu 2:** Avaluar si abandonar la rutina diària d'entrenament permet revertir el procés fibròtic induït per l'exercici.

**Objectiu 3:** Avaluar l'efecte de l'administració d'un antagonista del receptor AT1 de l'angiotensina, com el Losartan, en la prevenció de la formació de fibrosi cardíaca induïda per l'exercici.

# **MATERIALS I MÈTODES**

# **3. MATERIALS I MÈTODES**

#### **3.1. MODEL EXPERIMENTAL**

#### 3.1.1. Animals d'experimentació

Es van utilitzar rates mascles (*Rattus norvegicus*) de la soca Wistar (Charles River Laboratories, France) de quatre setmanes d'edat i un pes corporal aproximat entre 100-125 g al inici dels experiments. Els animals es van estabular en condicions ambientals constants de temperatura 22-24 °C i humitat relativa 60-65 % amb cicles alternats de llum/foscor de 12 h. Se'ls va subministrar una dieta estàndard de pinso A04 (Panlab, Barcelona) i aigua de la xarxa de Barcelona *ad limitum*. Tots els estudis es van realitzar d'acord amb les normes reguladores de la Unió Europea per models d'experimentació animal (Directiva 86/609/EEC).

#### 3.1.2. Protocol d'exercici

Amb la finalitat d'induir fibrosi cardíaca provocada per la practica d'exercici intens i continuat, es va haver de desenvolupar un nou model experimental, que permetés sotmetre als animals a un protocol d'exercici de llarga durada. Per dur-ho a terme, es va utilitzar una cinta corredora per a petits animals (Treadmill, Panlab, Barcelona), que és una eina amplament emprada en diversos estudis (222;232;233). Bàsicament, aquest aparell està format per una cinta rodant de velocitat i pendent regulable, connectada a una unitat de control. Quan les rates corren segueixen una determinada pauta de comportament, coneguda com parada i arrencada ("stop and go"), que es caracteritza per unes petites aturades durant la marxa. Les cintes corredores que utilitzades en aquests estudis han estat dissenvades tenint en compte aquests requeriments especials dels animals. És a dir, tant la llargada com l'amplada dels diferents carrils son adequats i permeten als animals seguir la seva pauta de comportament natural al córrer. A més, el tapís sobre el que corren, està construït amb materials especialment seleccionats per garantir la comoditat dels animals, un bon rendiment en condicions d'utilització intenses i un fàcil manteniment. Per altre banda, amb l'objectiu d'assegurar que els animals corren, al final de la cinta, hi ha una reixa que subministra descàrregues elèctriques de intensitat constant regulable (entre 0 i 2 mA) que s'activa quan entra en contacte amb les potes dels animals. La unitat de control permet establir els paràmetres de velocitat i intensitat de descàrrega, alhora que mostra i enregistra la velocitat, el pendent, la distància recorreguda, i les vegades i l'estona que s'ha aturat cada animal.

Material i mètodes

Al inici de cada experiment els animals es van distribuir a l'atzar entre els diferents grups experimentals: animals control de vida sedentària i animals sotmesos a exercici. El protocol d'exercici, va consistir en la realització de sessions diàries d'exercici de 90 minuts de duració a una intensitat de 60 cm/s, cinc dies a la setmana, durant 4, 8 o 16 setmanes depenent de l'estudi. Prèviament, es va establir un període d'adaptació de dues setmanes, tant a la cinta corredora com al protocol d'exercici, consistent en una primera sessió de 10 min a 25 cm/s, incrementant poc a poc tant el temps com la intensitat, fins arribar als 90 min a 60 cm/s al desè dia. Durant aquest període d'adaptació, just deprés d'acabar cada sessió d'exercici, els animals van ser recompensats amb un quart de galeta (Maria Fontaneda) a mode de reforç positiu. Les rates sedentàries van ser estabulades i tractades seguint les mateixes condicions amb la única diferència que no van realitzar cap sessió d'exercici durant l'estudi. Els animals es van pesar cada dia, el grup dels sedentaris una vegada al dia i el grups sotmesos a exercici abans i després de la sessió d'exercici.

Les sessions d'exercici van ser supervisades en tot moment per tal de garantir una pràctica efectiva de l'exercici i la integritat dels animals. A més, diàriament es va fer una revisió de les extremitats i de l'aparença dels animals. Com a protocol de supervisió del dolor dels animals, es van considerar les següents variables: pèrdua de pes (pes diari dels animals), aspecte i automutilació. Els animals ferits, que presentaven signes d'estrès o patiment, o que es van negar a córrer repetidament, van ser exclosos de l'experiment.

En tots els temps d'estudi i per tal d'evitar els efectes aguts de l'exercici, els animals van ser sacrificats 72 hores després de la darrera sessió d'exercici, mitjançant una injecció intraperitoneal de pentobarbital sòdic (Euta-lender Normon, Madrid, Espanya) a una dosis de 100 mg/kg. Posteriorment es a procedir a la seva exsanguinació per l'aorta abdominal, i es van obtenir mostres de plasma. Els cors van ser extrets, pesats i diseccionats en les seves diferents parts, ventricle dret, ventricle esquerre, aurícula dreta i aurícula esquerra. Després es van congelar ràpidament a -80 °C fins a ser analitzats. En tots els temps d'estudi quatre animals de cada grup van ser processats per estudis histològics.

# 3.2. DISSENYS EXPERIMENTALS

# 3.2.1. Estudi 1 : Evolució de la fibrosi cardíaca induïda per l'exercici

Per tal d'avaluar l'evolució dels canvis en el cor dels animals provocats per la pràctica d'exercici, es van establir diferents temps d'estudi: 4, 8 i 16 setmanes d'exercici. El disseny i la distribució de grups experimentals va ser el següent:

Sedentari 4 setmanes (S4) (n=8) Sedentari 8 setmanes (S8) (n=8) Sedentari 16 setmanes (S16) (n=12) Exercici 4 setmanes (E4) (n=11) Exercici 8 setmanes (E8) (n=11) Exercici 16 setmanes (E16) (n=14)

El protocol d'exercici va ser el descrit anteriorment i no va ser necessari excloure cap animal per lesió greu o per negar-se a córrer.

# 3.2.1.1. Valoració dels canvis estructurals per ecocardiografia

Per tal de fer un millor seguiment dels canvis estructurals provocats en el cor, es va realitzar un experiment addicional enfocat a determinar les dimensions cardíaques i els canvis en la funció cardíaca, per mitja de l'ecocardiografia transtoràcica. Les mesures es van realitzar en els animals al inici de l'experiment, a les 8 setmanes, i a les 16 setmanes. El disseny i la distribució de grups experimentals va ser el següent:

Sedentari inici de l'experiment (Si) (n=11) Sedentari 8 setmanes (S8) (n=11) Sedentari16 setmanes (S16) (n=11) Exercici inici de l'experiment (Ei) (n=12) Exercici 8 setmanes (E8) (n=12) Exercici16 setmanes (E16) (n=12)

El protocol d'exercici va ser el descrit anteriorment i no va ser necessari excloure cap animal per lesió greu o per negar-se a córrer. Les mesures es van realitzar després d'un període de 6 hores de inactivitat després de la darrera sessió d'exercici.

# 3.2.1.2. Valoració de la inducibilitat d'arítmies "in vivo" i Índex de Fulton

Per tal d'avaluar els paràmetres electrofisiològics dels ventricles i la inducció d'arítmies *in vivo*, es va realitzar un experiment addicional a 16 setmanes. El disseny i la distribució de grups experimentals va ser el següent:

Sedentari16 setmanes (S16) (n=10) Exercici16 setmanes (E16) (n=11)

El protocol d'exercici va ser el descrit anteriorment i no va ser necessari excloure cap animal per lesió greu o per negar-se a córrer. Les rates de vida sedentària van estar estabulades i alimentades en les mateixes condicions. Com en els experiments anteriors i per tal d'evitar els efectes aguts de l'exercici, els animals van ser sacrificats 72 hores després de la darrera sessió d'exercici, mitjançant una injecció intraperitoneal de pentobarbital sòdic a una dosis de 100 mg/kg. Els cors van ser extrets i pesats ràpidament. A continuació, els cors es van dissecar en les seves parts que es van pesar individualment per tal de poder calcular la relació entre el pes de les parets del ventricle esquerra i el pes de la paret del ventricle dret, o "Índex de Fulton" (<sup>234</sup>). Després es van congelar a -80 °C fins a ser analitzats.

# 3.2.1.3. Anàlisi estadístic

Els resultats estan expressats per el promig ± SEM amb un interval de confiança del 95 %. Els anàlisis estadístics es van realitzar per l'anàlisi de la variança (Two-Way ANOVA) seguit del apropiat *post hoc* test que va incloure el test Neuman-Keuls quan les diferències van ser significatives. Per a les mesures de pes corporal, la quantificació de picrosirius i la determinació d'hidroxiprolina, es van fixar els factors temps i exercici. Per a les valoracions d'expressió d'mRNA per RT-PCR, es van fixar els factors de cambra cardíaca i exercici. En les valoracions d'expressió proteica per Western Blot, els grups sedentari i exercici, es van comparar per anàlisis t-tests. I finalment, el test exacte de Fisher es va emprar per a comparar les variables de freqüència en les mesures ecocardiogràfiques. Tots aquests estudis estadístics es van fer amb el programa informàtic (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Es van considerar significatius els valors de p<0.05.

# 3.2.2. Estudi 2: Avaluació de la reversió de la fibrosi cardíaca induïda per exercici.

El següent experiment es va realitzar per tal d'avaluar la capacitat de reversió en els canvis morfològics i en la fibrosis cardíaca, induïts per l'exercici en el cor. Per això, es va dissenyar el següent protocol: després de 16 setmanes d'exercici, els animals van deixar de córrer durant 2, 4 o 8 setmanes. D'aquesta manera es va determinar quin temps era necessari per iniciar un procés de reversió dels danys ocasionats per l'exercici. Els animals es van distribuir entre els següents grups experimentals:

Sedentaris 16 setmanes (S) (n=8) Sedentaris 18 setmanes (S18) (n=8) Sedentaris 20 setmanes (S20) (n=8) Sedentaris 24 setmanes (S24) (n=8) Exercici 16 setmanes (E) (n=12) Repòs 2 setmanes (R2) (n=12) Repòs 4 setmanes (R4) (n=12) Repòs 8 setmanes (R8) (n=12)

El protocol d'exercici va ser el descrit anteriorment i no va ser necessari excloure cap animal per lesió greu o per negar-se a córrer. Els animals van ser sacrificats 72 h després de la seva darrera sessió d'exercici, o després de 2, 4, 8 setmanes després de la darrera sessió d'exercici.

# 3.2.2.1. Anàlisi estadístic

Les dades estan expressades pel valor promig ± SEM amb el 95 % d'interval de confiança. Les anàlisis estadístiques es van realitzar per l'anàlisi de la variança (One-Way ANOVA) seguit del apropiat *post hoc* test que va incloure el test Neuman-Keuls quan les diferències van ser significatives (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Es van considerar significatius els valors de p<0.05.

# 3.2.3. Estudi 3: Efecte del Losartan en la prevenció de la fibrosi cardíaca

En aquest estudi es va avaluar l'efecte del Losartan com a tractament per a prevenir la formació de fibrosis cardíaca induïda per l'exercici. El Losartan és un fàrmac antihipertensiu que bloqueja el receptor AT1 de l'angiotensina-II. Els animals van ser distribuïts en els següents grups experimentals:

Sedentaris (n=6) Sedentaris + Losartan (Sedentaris+LOS) (n=6) Exercici (n=7) Exercici + Losartan (Exercici+LOS) (n=7)

El protocol d'exercici va ser el descrit anteriorment i no va ser necessari excloure cap animal per lesió greu o per negar-se a córrer. L'administració del Losartan va ser via oral (50 mg/kg pes animal per dia) dissolt en 1,5 ml d'aigua abans de cada sessió d'exercici. Es va escollir l'administració oral ja que és el mètode utilitzat en la pràctica clínica. El tractament es va iniciar amb la primera sessió d'exercici i es va mantenir al llarg de tot l'experiment sempre a la mateixa hora.

# 3.2.3.1. Anàlisi estadístic

Els resultats estan expressats pel valor promig ± SEM amb el 95 % d'interval de confiança. Els anàlisis estadístics es van dur a terme per l'anàlisi de la variança (One-Way ANOVA) seguit del apropiat *post hoc* test que va incloure el test Neuman-Keuls quan les diferències van ser significatives. (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Es van considerar significatius els valors de p<0.05.

# 3.3. PARÀMETRES ESTUDIATS

# 3.3.1. Hipertròfia cardíaca

La hipertròfia del múscul cardíac es va avaluar segons la relació entre el pes del cor sencer i el pes corporal (<sup>235;236</sup>). A les 16 setmanes la massa de cada una de les cambres cardíaques també es va mesurar individualment i es va normalitzar pel pes de l'animal. Es va aplicar la formula de Fulton per tal de relativitzar la hipertròfia del ventricle esquerre respecte al dret (pes de la paret lliure del ventricle esquerre (VE-pll) + pes de la paret del septe interventricular (IV)/ pes de la paret del ventricle dret (<sup>234</sup>). A més, per examinar la hipertròfia ventricular es van fer mesures del gruix de les parets del ventricle dret (VD), septe interventricular (IV) i de la paret lliure del ventricle esquerre (VE-pll) en fotografies de talls histològics de sencer tallat transversalment a l'alçada de l'inserció dels músculs papil·lars obtingudes amb una lupa binocular a 4x augments (Figura 10). Per a cada animal es van realitzar 12 mesures en cada una de les parets utilitzant el programa *analySIS Image Processing software* (Soft Imaging System GMBH, Germany) que es van corregir pel pes corporal (<sup>237</sup>).



*Figura 10: Esquema del tall transversal dels ventricles del cor.* VE-pll: Paret lliure del ventricle esquerre. IV: Septe nterventricular. VD: Ventricle dret.

#### 3.3.2. Dimensions i funció cardíaca per ecocardigrafia

El procediment es va dur a terme sota anestèsia general amb isofluorà al 2%. La imatge ecocardiogràfica en mode M a l'eix llarg del pla parasternal a l'alçada de la vàlvula aòrtica es va obtenir mitjançant una sonda de matriu gradual 10S (4,5-11,5 Megaherz) amb l'aparell Vivid 7 Dimension sistem (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Norway). Es van prendre mesures de la dimensió de l'aurícula esquerra a final de la sístole, de la dimensió del ventricle dret i del gruix de la seva paret al final de la diàstole cardíaca. L'espectre en mode M també es va obtenir a l'eix curt del pla parasternal, a l'alçada dels músculs papil·lars i es va mesurar la dimensió ventricular esquerra tant al final de la diàstole cardíaca com de la sístole. La fracció d'ejecció del ventricle esquerre es va calcular mitjançant la fórmula que ve integrada en l'aparell (Vivid 7 system). Aprofitant aquest pla també es va mesurar el gruix de les parets anterior i posterior del ventricle esquerre. Donades les diferències en la mida dels animals en els diferents temps d'estudi, es van normalitzar les dimensions cardíaques pel pes corporal. La massa del ventricle esquerre es va calcular seguint la formula de Reffelmann i col·laboradors (238). Els fluxos transmitral, transtricúspide i el de les venes pulmonars, es van enregistrar per ona doppler polzada de quatre canals en el pla apical. El pic de la velocitat de l'ona d'emplenament inicial i el seu temps de desceleració, van ser mesurats en el flux transmitral i transtricúspide. Els pics de velocitat en l'ona de la sístole i la de la diàstole van ser mesurats en el flux de les venes pulmonars. El moviment de l'anell mitral lateral, del septe i de la tricúspide durant l'emplenament inicial van ser derivats per imatge tissular doppler de quatre canals en el pla apical. El pla de l'anell tricúspide durant l'excursió sistòlica va ser mesurat per ecocardiograma en mode M. La paret lateral del ventricle dret en moviment i la velocitat sistòlica van ser obtingudes per imatge tissular doppler de quatre canals en el pla apical. La conjunció dels fluxos d'entrada i de sortida del ventricle esquerre es va enregistrar per ona Doppler continua de 5 canals en el pla apical. El temps de relaxació isovolumètrica també es va mesurar per ona Doppler continua de 5 canals en el pla apical i es va corregir per intervals R-R agafats de ecocardiogrames enregistrats simultàniament. Per a cada mesura es va utilitzar el promig de 3 cicles cardíacs consecutius.

#### 3.3.3. Electrofisiologia i estimulació cardíaca

El procediment es va dur a terme sota anestèsia general amb isofluorà al 2 % i es va administrar buprenorfina (0.03-0.05 mg/kg i.p.) com a analgèsic. Per evaluar l'inducibilitat d'aritmies es va introduir un electrocatèter octapolar de mida 19 F per la

Material i mètodes

vena jugular dreta fins al ventricle dret. L'ecocardiogramma de superfície (derivació I) i l'ecocardiograma intracardíac del ventricle dret van ser enregistrats mitjançant el convertidor digital-analògic IOX 1.585 (Tecnologías de la EMKA, París, França). Per tal de determinar el període refractari ventricular efectiu, l'estimulació del ventricle dret es va dur a terme en una amplada de cicle de 150 ms (PRVE). Les mesures relatives a la duració tant del fragment QRS com de l'electrocardiograma intracardíac del ventricle dret, es van interpretar com a índexs de la conducció ventricular. Per l'avaluació de la capacitat d'inducció d'arítmies ventriculars, es van utilitzar tècniques de doble i triple extraestimulació. L'administració es va fer en intervals d'acoplament de 30 ms durant el ritme sinusal espontani seguint un ritme de 9 batecs en amplades de cicle de 150 ms. Si després de 2 o 3 estímuls no s'aconseguia una arítmia sostinguda es va realitzar una extraestimulació en el ventricle dret de cicles entre 60 i 80 ms. Es va considerar arítmia ventricular sostinguda a episodis d'arítmia ventricular de com a mínim 10 s de duració.

#### 3.3.4. Histologia

Els animals designats per a estudis histològics van ser perfosos per l'aorta abdominal, primerament, amb una solució de salí per eliminar la sang i tot seguit amb una solució tamponada de formol al 10 % a una pressió de 80 cm H<sub>2</sub>O. Posteriorment es va procedir a l'extracció del cor, es va fixar amb una solució tamponada de formol al 10% durant un mínim de 24 h, posteriorment es va incloure en blocs de parafina i es van fer talls d'un gruix de 5 µm. Finalment, les mostres es van tenyir amb hematoxilina-eosina, tricròmica de Masson, vermell de Picrosirius, o es van fer immunohistoquímiques pel seu posterior anàlisi al microscopi.

#### 3.3.4.1. Tricròmica de Masson

La tinció tricròmica de Masson s'utilitza per aconseguir la coloració diferencial del teixit connectiu (<sup>239-241</sup>). Aquesta tinció es realitza amb tres colorants per tal de diferenciar nuclis, citoplasma i fibres de col·lagen.

Les preparacions primer es tenyeixen amb hematoxilina fèrrica de Weigert que tenyeix els nuclis de color blau. Tot seguit, s'aplica un colorant àcid (escarlata de Biebrich), amb afinitat per als components cel·lulars acidòfils com el citoplasma, el múscul i el col·lagen. A continuació, es tracten les mostres amb àcid fosfotúngstic o fosfomolibdic que fa que el col·lagen (però no el citoplasma) difongui la escarlata de Biebrich. Els àcids fosfomolíbdic i fosfotúngtics tenen nombrosos grups àcids que

actuen com a medi d'unió entre el col·lagen i el blau d'anilina, que és un colorant catiònic utilitzat per a tenyir col·lagen. El resultat obtingut en aquesta tinció mostra les cèl·lules amb els nuclis negres, el citoplasma, la queratina i les fibres musculars de color rosat, vermell i marró respectivament. I finalment, les fibres de col·lagen de color blavós. En la valoració de les mostres es va determinar la presència de col·lagen intersticial, com a marcador de fibrosi.

#### 3.3.4.2. Vermell de Picrosirius

Per tal de quantificar la fracció de col·lagen intersticial, es van fer mesures de l'extensió de fibrosis tant en el ventricle dret com en l'esquerre per histomorfometria tenyits amb vermell de picrosirius (<sup>242</sup>).

El vermell de picrosirius és una altra de les tècniques que més s'utilitza per tenyir específicament el col·lagen, ja que té una alta afinitat, inclús per les fibres més fines de col·lagen. Aquest mètode es basa en la tinció de les fibres de col·lagen amb una solució de vermell de sirius en àcid pícric saturat, els resultats que s'obtenen mostren les fibres de col·lagen en color vermell i el citoplasma en un color groc o rosat més apagat. En el cas d'haver fet una contra tinció amb hematoxilina, els nuclis es veuran de color blau fosc o negre. A més a més, aquesta tècnica permet diferenciar les fibres gruixudes de les primes quan les observacions es fan amb llum polaritzada (<sup>243</sup>).

Per quantificar la fibrosi es van fotografiar deu camps per mostra amb el microscopi òptic a 40x augments i es va mesurar la deposició de col·lagen per mitjà del programa informàtic d'anàlisi i tractament d'imatge *analySIS Image Processing software* (Soft Imaging System GMBH, Germany) amb el qual es van mesurar i quantificar les zones tenyides en color vermell sobre el fons més pàl·lid excloent les regions perivasculars.

#### 3.3.4.3. Immunofluorescència

Per tal d'avaluar la presència de miofibroblasts en el teixit cardíac, es van realitzar tècniques d'immunofluorescència. Per això, es va marcar el principal marcador de miofibroblasts (<sup>244</sup>), l'actina de múscul llis alfa ( $\alpha$ -SMA), en talls histològics inclosos en parafina. Per fer-ho, es va utilitzar com a anticòs primari, l'anticòs monoclonal de ratolí anti- $\alpha$ -SMA (ab18147 Abcam plc, Cambridge, UK) i com a secundari l'anticòs contra ratolí conjugat amb isocianat de fluoresceïna (FICT) (R1349F Acris antibodies, GmbH, Herdford, GE).

Material i mètodes

Després de desparafinar, rehidratar i permeabilitzar les mostres, el teixit va rebre un tractament de clorur amònic (50 mM) en PBS per tal de disminuir l'autofluorescència del teixit. El bloqueig de les unions inespecífiques es va dur a terme amb una solució de sèrum de cabra al 3% i gelatina al 0.2% en PBS durant dues hores a temperatura ambient. L'anticòs primari es va diluir 1:15 en solució de bloqueig i es va incubar a 4 °C durant tota la nit, la dilució de treball de l'anticòs secundari va ser 1:600 i es va incubar durant dues hores a temperatura ambient. Per tenyir el nuclis es va fer servir una solució de iodur de propidi (1µg/ml) i RNasa A (10 µg/ml) dissolts en PBS (Sigma, St. Louis, Mo., USA). Com a control negatiu es van utilitzar mostres sense incubar amb l'anticòs primari.

El marcatge positiu per α-SMA va ser avaluat en totes les mostres de teixit per microscòpia de fluorescència. La captació de les imatges es va fer mitjançant el microscopi laser confocal espectral Leica TCS SPE (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Manheim, Germany) amb làser de 488, 532, i 635 nm. El iodur de propidi i el FICT van ser exposats a 488 nm i les seves emissions van ser detectades a 530-630 nm i 488-515 nm, respectivament. Totes les imatges es van obtenir a 100x augments i a 630x augments, aquestes darreres per mitjà d'immersió en oli. L'ensamblatge de les imatges i el seu tractament es va dur a terme amb el programa informàtic Image LAS AF Confocal Software.

# 3.4. DETERMINACIONS EN TEIXIT

# 3.4.1. Hidroxiprolina

La hidroxiprolina prové de la hidroxilació de la prolina. L'aparició d'aquest aminoàcid es dóna exclusivament quan hi ha formació de col·lagen en el teixit connectiu (<sup>245</sup>). El col·lagen és la proteïna més abundant del teixit conectiu, representant un terç de les proteïnes del cos. És per això, que la mesura de la hidroxiprolina s'utilitza per l'estudi del metabolisme i la regulació del col·lagen. La determinació dels nivells d'hidroxiprolina constitueix un marcador de fibrosi, ja que ens indica la quantitat de col·lagen de nova síntesi. La tècnica es basa en la hidrolització del teixit i la determinació de la presència de hidroxiprolina en l'hidrolitzat. El procediment es va realitzar amb mostres de ventricle dret i de ventricle esquerre seguint el mètode descrit per Woessner (<sup>246</sup>). Les mostres es van homogeneïtzar, es van assecar i es van hidrolitzar durant 18 h en una solució de HCl 6M h a 120 °C. A continuació, després de neutralitzar l'hidrolitzat, es va fa servir Cloramina-T per oxidar la hidroxiprolina i finalment es va afegeix reactiu d'Erhlich que dóna lloc a la formació d'un cromòfor que es pot mesurar en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 550 nm.

# 3.4.2. RT- PCR

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) és una tècnica molt utilitzada en biologia molecular per l'estudi de l'expressió de gens d'interès. Un cop extret l'RNA total, es passa a cDNA per retrotranscripció. Això s'aconsegueix gràcies a l'acció de la retrotranscriptasa, un enzim que sintetitza cDNA utilitzant l'RNA com a motlle. Posteriorment, s'amplifica aquest cDNA per PCR a temps real utilitzant encebadors específics.

L'extracció de l'RNA total es va fer per homogeneïtzació amb TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California) de trossos de teixit entre 50 i 100 mg procedents de les diferents parts del cor. El TRIzol® és un reactiu que permet l'aïllament d'RNA total a partir de teixits o de cèl·lules. L'obtenció d'RNA i la posterior purificació amb columnes RNAeasy *MiniElute Cleanup* (Qiagen, Hilden, Germany) es va realitzar seguint les instruccions dels proveïdors. Bàsicament, el Trizol és una solució que lisa les cèl·lules i dissol els seus components mantenint la integritat de l'RNA. Un cop homogenat el teixit, s'afegeix cloroform i es centrifuga de manera que

queden dues fases separades, una orgànica i una aquosa on es troba l'RNA. L'RNA es precipita amb etanol al 70% i es passa per les columnes de purificació.

L'RNA extret es va dissoldre en aigua dietil pirocarbonada *Nuclease-free water* (Qiagen, Hilden, Germany) i es va valorar la seva integritat i concentració per densitat òptica a 260 i 280 nm mitjançant l'espectrofotòmetre *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, USA). L'RNA es va congelar a -80 °C fins al moment de la seva utilització.

La conversió d'1 µg d'RNA a cDNA es va dur a terme amb el kit *iScript cDNA* de *BioRad* (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA). La reacció es va incubar a 25 °C durant 5 min, 42 °C durant 30 min i 85 °C durant 5 min per acabar a 4 °C: L'aparell amb el qual es va realitzar: *DNA Engine, Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA).

Un cop obtingut el cDNA, es tracta de detectar i analitzar la quantitat de producte generat a cada cicle d'amplificació. Aquesta quantitat de producte està directament relacionada amb la quantitat de cadenes de cDNA que hi ha a l'inici del procés de la PCR. Gràcies al mètode de detecció per fluorescència dels termocicladors a temps real es pot determinar l'acumulació del producte amplificat cicle a cicle.

Els nivells d'expressió de l'RNA es van mesurar per PCR a Temps Real utilitzant oligonucleòtids i sondes TaqMan (TaqMan gene expression assays) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), el *mix buffer* Universal PCR Master Mix No Amp Erase<sup>®</sup> UNG (Applied Biosystems, CA, USA) i l'aparell i Cycler iQ Multicolor Real Time PCR (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Aquest sistema de sondes aprofita l'activitat exonucleasa 5' a 3' de la *Taq* polimerasa. Es dissenya una cadena dins la regió flanquejada pels encebadors estàndards. Aquesta cadena actua com a sonda ja que porta un fluorocrom unit a l'extrem 5' i una altra molècula que fa de pantalla (*quencher*) situada a l'extrem 3' que per proximitat absorbeix la fluorescència del fluorocrom. Quan la *Taq* polimerasa arriba a l'extrem 5' allibera el fluorocrom mitjançant la seva acció exonucleasa i l'allunya del *quencher* present a l'extrem 3', moment en el qual el fluorocrom emet fluorescència. D'aquesta manera el sistema esdevé altament específic ja que el fluorocrom només produeix fluorescència quan s'ha amplificat la cadena d'interès.

El procés d'amplificació va consistir en un primer pas de 10 min a 95 °C per tal d'activar la polimerasa. A continuació 40 cicles d'amplificació. Cada pas consisteix en

un primer pas de desnaturalització de 30 s a 95 °C per separar les cadenes de cDNA, seguidament el pas d'hibridació amb els oligonucleòtids i les sondes de 30 s a 60 °C, l'elongació de 20 s a 72 °C i finalment, una incubació a 72 °C durant 2 min per acabar el procés d'amplificació.

Les dades van ser avaluades mitjançant el programa IQ 5 (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA) d'acord amb les recomanacions del fabricant. Els resultats es van analitzar segons el mètode del  $\Delta$ Ct utilitzant la  $\beta$ -actina com a gen control de l'expressió gènica endògena (<sup>247</sup>). La Taula 1, mostra les diferents sondes que es varen utilitzar per l'amplificació dels gens corresponents a:  $\beta$ -Actina, TGF- $\beta$ 1, Fibronectina-1, MMP-2, TIMP-1, Procollagen-1, Procollagen-3.

Marcador	Sonda
β-Actina	Rn00667869-m1
TGF-β1	Rn00572010-m1
Fibronectina-1	Rn00569575-m1
MMP-2	Rn02532334-s1
TIMP-1	Rn00587558-m1
Procollagen-1	Rn01526721-m1
Procollagen-3	Rn01437675-m1

Taula 1.- Sondes TaqMan emprades en Real Time PCR:

# 3.4.3 Western-Blot

El Western-blot és una tècnica que permet determinar la quantitat d'una proteïna en concret present en una mostra. Les metodologies que s'utilitzen per la realització d'un Western-blot són: en primer lloc, l'obtenció de l'extracte proteic i la determinació de la concentració de proteïna. I seguidament la detecció de proteïnes del lisat per mitjà de l'electroforesi, l'electrotransferència a una membrana de nitrocel·lulosa i la detecció de la proteïna desitjada per immunoquimioluminiscència.

Es va utilitzar un mètode de lisi estàndard per tal d'obtenir l'extracte de proteïna total. El teixit es va homogenitzar en tampó de lisi Nonidet-P40 i posteriorment es va centrifugar. El sobrenedant amb l'extracte proteic es va recuperar, quantificar i congelar a -80 °C.
Composició del tampó de lisis Nonidet-p40:

- 20 Mm Tris-HCl pH 8
- 137 mM NaCl
- 10 % Glicerol
- 1 % Nonidet P-40
- 2 Mm EDTA

Es van afegir inhibidors de proteases i fosfatases per evitar processos de proteòlisi, desfosforilació i desnaturalització. En el nostre cas es van utilitzar els següents inhibidors de proteases i fosfatases:

- EDTA: inhibidor de calçi quelat i ions de magnesi
- Ortovanadat Sòdic (1mM): inhibidor de les fosfatases sobre les tyrosines.
- Fluorur Sòdic (5-10 mM): inhibidor de les fosfatases sobre serines i treonines.
- Aprotonina (2 µg/ml): és un inhibidor de proteases en general.
- Leupeptina (5-10 µg/ml): és un inhibidor de proteases lisosomals.
- Anti-pain (2-10 µg/ml): inhibidor de tripsina i plasmina.
- Pepstatina (1 µg/ml): és un inhibidor de proteases de l'àcid aspàrtic.
- PMSF (1mM): és inhibidor de proteases en general.

La valoració de proteïnes es va fer amb el mètode colorimètric de Bradford (BioRad, Richmond, CA, USA). Aquest assaig es basa en la reacció d'una solució àcida del colorant blau de Coomassie en resposta a diferents concentracions de proteïnes. El canvi de color que experimenta el blau de Coomassie al unir-se a proteïnes es pot mesurar en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm. Per tal de portar a terme aquesta valoració és necessari la preparació d'una corba estàndard que es va realitzar amb una solució d'Albúmina Sèrica Bovina (BSA) a diferents concentracions.

L'electroforesi de mostres de proteïna en gels d'acrilamida és una eina molt útil que es pot usar per separar i comparar complexes proteics, avaluar la puresa de les proteïnes en processos de purificació o avaluar característiques físiques de les proteïnes (mida, pes molecular, càrrega, punt isoelèctric). El sistema més emprat per a la separació de les proteïnes en funció de la seva mida és el SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-PoliAcrilamide Gel Electroforesis*) en condicions desnaturalitzats. En aquest sistema s'utilitza el detergent SDS que desnaturalitza les proteïnes i els dóna una forta càrrega negativa. La majoria de les proteïnes s'uneixen a una quantitat constant d'SDS per microgram de proteïna, la qual cosa els dóna una

densitat de càrrega uniforme que depèn tan sols de la seva massa. Les proteïnes es separen aleshores en una matriu de poliacrilamida-bisacrilamida aplicant un camp elèctric. Això permet separar les proteïnes únicament per la seva massa. Tot i això pot passar que proteïnes molt carregades tinguin una mobilitat electroforètica que no correspongui amb la seva massa, ja que la càrrega global de la proteïna també influeixi en la seva mobilitat.

Prèviament a l'electroforesi, les mostres de proteïna es van barrejar amb el tampó de càrrega que conté l'SDS. La seva mobilitat en el gel d'acrilamida depèn també de la mida de porus del gel, que alhora ve determinat per la concentració de d'acrilamida.

La matriu d'acrilamida té dues parts diferenciades: el gel separador (running) i a sobre d'aquest, el gel empaquetador (stacking). La diferència entre aquestes dues parts és la concentració d'acrilamida (menor en el gel empaquetador) i el tampó TRIS que en el gel empaquetador té una molaritat diferent i un pH més àcid. El percentatge d'acrilamida determina el diàmetre del porus que tindrà el gel un cop hagi polimeritzat. Aproximadament, el gel empaguetador té un 3,3 % d'acrilamida, el gel separador pot tenir entre el 7,5 i el 15 %. El gel empaquetador permet una elevada migració de les proteïnes sense gaire diferència entre proteïnes de massa diferent. Això permet que totes les proteïnes entrin al gel separador alhora. En el gel separador és on es dóna la diferència de mobilitat electroforètica segons el pes molecular de la proteïna. La mida del porus (i per tant la concentració de d'acrilamida) es tria en funció del pes molecular de la proteïna d'interès: per a proteïnes grans s'utilitzen gels amb baix percentatge d'acrilamida i per a proteïnes petites, gels amb alt percentatge. En paral·lel a les mostres analitzades es fa córrer un marcador de pesos moleculars (Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker, GE Healthcare, NY, USA). Aquest, consisteix en diverses proteïnes de pes molecular conegut premarcades, de manera que són visibles sense cap tractament. Això indicarà el grau de separació entre les proteïnes i serveix per estimar el pes de les proteïnes estudiades. Aquest marcador també és útil per seguir l'avanç de l'electroforesi i l'eficiència de la transferència a membranes.

Les solucions utilitzades van ser les següents:

Tampó de càrrega (4X)
 950 μl XT Sample Buffer 4X (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA)
 50 μl β-mercaptoetanol

Gel d'empaquetament
 1.5 M Tris HCI (pH 8.8)
 30 % Acrilamida
 10 % SDS
 10 % APS
 TEMED

- Gel separador
  - 1 M Tris HCI (pH 6.8)
  - 30 % Acrilamida
  - 10 % SDS
  - 10 % APS
  - TEMED
- Tampó d'electroforesi (10X)
  10 X *Tris Glycine SDS* (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA)

Les mostres es van preparar afegint tampó de càrrega i escalfant 5 minuts a 100 °C per desnaturalitzar les proteïnes. El sistema d'electroforesi utilitzat va ser el *Mini-PROTEAN* (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Les mostres es van carregar al gel d'acrilamida i es va fer córrer a voltatge constant (100 V) fins que el blau de bromofenol de les mostres va començar a escapar-se per la part de baix del gel. A cada pouet del gel es va carregar una quantitat de proteïna total que oscila entre els 40 i els 60 µg depenent de la proteïna d'estudi.

Per tal de poder treballar amb les proteïnes que s'han separat a l'electroforesi és útil transferir-les a un suport inert que les retingui. Amb aquesta intenció es fa la transferència de les proteïnes des de la matriu d'acrilamida a una membrana adequada. Hi ha diverses membranes que retenen les proteïnes de forma efectiva, en el nostre cas es van utilitzar membranes de nitrocel·lulosa Hybond ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Es tracta de posar el gel que ha migrat en contacte amb la membrana de nitrocel·lulosa i crear un camp magnètic que empenyi a les proteïnes a sortir del gel. D'aquesta manera les proteïnes es queden sobre la membrana i seran susceptibles a unir-se als anticossos específics.

La transferència es va realitzar en el sistema semi-Phor semi-dry transfer unit (Hoefer Inc, Holliston, MA, USA) durant 1h 30 min a 140 mA, en el cas de transferir els gels de 2 en 2. L'amperatge s'ha d'adaptat a la quantitat de gels que es transeferixen. El tampó de transferència emprat va ser el següent:

Tampó de transferència
 10 % *10X Tris Gycine* (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA)
 20 % MeOH

A continuació per tal d'assegurar que la transferència s'havia dut a terme de forma efectiva, i les proteïnes s'havien transferit a la membrana, es van localitzar les diferents bandes proteïques mitjançant la tinció de les membranes amb una solució de Ponceau S (0,1 % Ponceau S i 5 % d'àcid acètic en aigua destil·lada).

Un cop les proteïnes han estat transferides a la membrana ja estan disponibles per la detecció per anticossos. Per eliminar els llocs d'unió inespecífics, la membrana s'ha de bloquejar amb proteïnes no reactives. En el nostre cas es va fer servir una dissolució de llet descremada en pols que s'uneix als llocs d'unió inespecífics que queden a la membrana després de la transferència. Després de bloquejar-les, les membranes s'incuben amb l'anticòs primari (específic per la proteïna d'interès). En el següent pas, un anticòs secundari conjugat a l'enzim peroxidasa reconeix l'anticòs primari que s'ha unit a la proteïna d'interès. L'últim pas és la detecció de la proteïna d'interès d'una reacció enzimàtica que té lloc quan afegim peròxid d'hidrogen.

El bloqueig de les membranes es va fer amb una solució al 5 % en llet descremada en pols en TBST-1X durant una hora a temperatura ambient:

• TBS 20X:

500 mM Tris (pH 7.4) 60 mM KCl 2.8 M NaCl

TBS 1X-T (TBS + 0.05 % Tween20)
 5 % llet descremada en pols

Les diferents membranes es van incubar amb els anticòssos primaris durant tota la nit a 4 °C i en agitació. La taula 2, mostra els anticossos amb les seves corresponents dilucions utilitzats per la quantificació de les següents proteínes: Actina, TGF- $\beta$ 1, Fibronectina-1, MMP-2, TIMP-1, Procollagen-1, Procollagen-3,  $\alpha$ -SMA. Cases comercials: Abcam Abcam plc, Cambridge, UK; Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany; Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA ; i Chemicon-Millipore Co, MA, USA.

Anticòs	Casa comercial	Referència	Pes molecular (KDa)	Font	Dilució
Actina	Chemicon	MAB1501	42	Ratolí	1:1000
TGF-β1	Abcam	ab27969	12,25,50	Ratolí	1:2000
Fibronectina-1	Acris	BP8025	190	Conill	1:1000
MMP-2	Abcam	ab7032	62	Ratolí	1:1000
TIMP-1	Abcam	ab61224	22	Conill	1:1000
Procollagen-1	Abcam	ab6308	95	Ratolí	1:1000
Procollagen-3	Santa Cruz	Sc28888	190	Conill	1:500
α-SMA	Abcam	ab18147	42	Ratolí	1:1000

Taula 2.- Anticossos primaris utilitzats en el Western Blot

Un cop ha transcorregut el temps d'incubació amb l'anticòs primari, es retira la membrana i es renta amb TBST-1X a temperatura ambient. Tot seguit s'incuba amb l'anticòs secundari a temperatura ambient durant 45-60 min. Tots els anticossos secundaris utilitzats estan conjugats amb peroxidasa de rave. La Taula 3, mostra els anticossos secundaris i les dil·lucions que es van fer servir.

Taula 3.- Anticossos secundaris utilitzats en el Western Blot

Anticòs	Casa comercial	Referència	Font	Dilució
Anti-mouse IgG HRP	BioRad	170-6516	Cabra	1:3000
Anti-rabbit IgG HRP	Santa Cruz	Sc2004	Cabra	1:4000

L'últim pas és la detecció de l'anticòs secundari gràcies a l'activitat peroxidasa. Els reactius de detecció que es van utilitzar són *l'Immun-Star HRP Peroxid Buffer* i *l'Immun-Star HRP Luminol/Enhancer* (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA) en proporció 1:1. Es van incubar les membranes amb al reactiu de luminescència durant 2 min en una cambra fosca de revelat, es va col·locar un film *Hyperfilm ECL* (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) sobre la membrana i es va deixar exposar el temps necessari. Tot seguit es van revelar els films en l'aparell Optimax X-Ray Film Processor (PROTEC, Germany). Un cop feta la detecció, la membrana es pot guardar a 4 °C ja que pot ser reutilitzada posteriorment per detectar altres proteïnes. Això es pot fer mitjançant el procés anomenat *stripping* que permet eliminar la presència d'anticossos de la membrana pràcticament sense alterar les proteïnes que s'hi han transferit. La membrana en qüestió és sotmet a un rentat de 5 min amb la

solució d'*stripping* en agitació. Tot seguit, s'augmenta ràpidament el pH a 7-8 i es renta 3 vegades amb el tampó de rentat TBST-1X. A partir d'aquí es segueix amb el protocol descrit anteriorment.

Solució d'stripping
 0,2 M glicina
 0,5 M NaCl (pH 2.8)

# RESULTATS

#### 4. RESULTATS:

4.1. ESTUDI 1 : EVOLUCIÓ DE LA FIBROSI CARDÍACA PROVOCADA PER L'EXERCICI

En aquest estudi es va evaluar l'efecte de l'exercici intens i continuat en el desenvolupament del remodelat cardíac per fibrosi.

# 4.1.1 Hipertròfia cardíaca i valoració dels canvis estructurals per ecocardiografia

A l'inici de l'experiment, el promig dels pesos corporals no mostraven diferències entre cap dels grups d'estudi. El pes corporal, el pes del cor i la proporció del pes del cor respecte del pes corporal estan resumits a la taula 4. L'exercici va provocar una disminució en el pes corporal en tots els grups experimentals. A les16 setmanes, aquesta pèrdua de pes va ser significativament diferent entre el grup d'animals d'exercici i el seu grup sedentari. El pes del cor no va mostrar canvis significatius entre els grups experimentals en cap dels temps d'estudi. En canvi, la proporció entre el pes del cor respecte el pes corporal, va mostrar un increment significatiu entre tots els grups que van realitzar exercici (4 setmanes, 8 setmanes, 16 setmanes) i els seus respectius grups sedentaris.

*Taula 4: Pes corporal, pes del cor i proporció entre pes del cor/pes corporal. S:* Sedentari. *E:* Exercici. Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 4 animals en el cas dels grups sedentaris a 4 i 8 setmanes, de 5 animals en el cas dels grups exercici de 4 i 8 setmanes, 6 animals en el grup sedentari de 16 setmanes i 8 per al grup exercici de 16 setmanes. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

			Pes corporal (g)	Pes del cor (g)	Pes cor (g)/ Pes corporal (g) (x1000)
4 setmanes	S4	(n=4)	359.00 ± 3.83	1.01± 0.05	$2.80\pm0.12$
rootmanoo	E4	(n=5)	318.67 ± 6.17	$1.04\pm0.04$	$3.26\pm0.16^{\textbf{*}}$
8 setmanes	S8	(n=4)	446.00 ± 9.50	$1.12\pm0.01$	$2.52\pm0.04$
	E8	(n=5)	$363.00\pm29.74$	$1.18\pm0.14$	$3.29\pm0.10^{\textbf{*}}$
16 setmanes	S16	(n=6)	471.83 ± 29.48	$1.11\pm0.06$	$2.35\pm0.06$
	E16	(n=8)	385.50 ±13.66*	$1.21\pm0.06$	$3.13\pm0.06^{\textbf{*}}$

L'Índex de Fulton, analitzat només en els grups experimentals de 16 setmanes, no va mostrar diferències significatives entre sedentaris i exercici. No obstant, el pes de cada una de les parets cardíaques (normalitzat pel pes corporal) va mostrar un increment significatiu en el grup d'exercici en comparació amb el grup sedentari. Els resultats dels pesos de les parets cardíaques i l'Índex de Fulton, es troben resumits a la taula 5.

*Taula5: Pes de les diferents parets cardíaques dels grups experimentals de 16 setmanes.* Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 9 animals en cada grup experimental. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

		Sedentaris (n=9)	Exercici (n=9)
Aurícula Dreta/ Pes corporal	(g/Kg)	$0.091\pm0.006$	$0.144 \pm 0.020^{*}$
Aurícula esquerra/ Pes corporal	(g/Kg)	$0.083\pm0.010$	$0.153 \pm 0.020^{\star}$
Ventricle Dret/ Pes corporal	(g/Kg)	$0.357\pm0.019$	0.433 ± 0.029*
Ventricle Esquerre/ Pes corporal	(g/Kg)	$1.837\pm0.057$	$2.212 \pm 0.098^{*}$
Septe Interventricular	(g/Kg)	$0.444\pm0.026$	$0.644\pm0.100$
Paret lliure del Ventricle Esquerre	(g/Kg)	$1.394\pm0.052$	1.568 ± 0.160
Índex de Fulton		$5.227\pm0.259$	$5.264 \pm 0.329$

El desenvolupament d'hipertròfia cardíaca, mesurada pel gruix de les parets dels ventricles, es va començar a observar a les 8 setmanes d'exercici (Figura 11). Concretament, després de 8 setmanes d'exercici es va observar un increment significatiu en el gruix de la paret lliure del ventricle esquerre. En el grup d'exercici de 16 setmanes, es va observar un increment significatiu en el gruix de la paret lliure del ventricle esquerre. En el grup d'exercici de ventricle esquerre i en el gruix de la paret del septe que separa els dos ventricles.



*Figura 11 : Gruixos de les parets ventriculars normalitzats per el pes corporal.* VD: ventricle dret. IV: septe interventricular. VE: ventricle esquerre. Els valors corresponen al valor promig  $\pm$  SEM de 4 animals per grup. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

Addicionalment, es va caracteritzar per ecocardiografia l'adaptació morfològica i funcional deguda a l'exercici. Aquests anàlisis només es van realitzar en els grups experimentals de 8 i 16 setmanes (Taula 6) ja que en el grup de 4 setmanes d'exercici no es van observar signes de hipertròfia.

Els resultats obtinguts a les 8 setmanes mostren un increment significatiu en el gruix de la paret lliure del ventricle esquerre i en el septe interventricular. En canvi, les mesures del diàmetre de la llum del ventricle esquerre, no van mostrar canvis significatius. Aquestes dades indiquen que a les 8 setmanes d'exercici intens els animals havien desenvolupat una hipertròfia concèntrica. Per altre banda, els resultats obtinguts en el grup d'exercici de 16 setmanes mostren un increment significatiu tant en el gruix de les parets del ventricle esquerre, com en el diàmetre de la seva llum, demostrant una evolució cap a la hipertròfia eccèntrica. A més, el conjunt de resultats obtinguts (disminució en la ona S del flux de la vena pulmonar, augment del temps de relaxació isovolumètrica i dilatació de l'aurícula) en els grups d'exercici a 8 i 16 setmanes, indiquen una disfunció diastòlica en el ventricle esquerre. El grup d'exercici a les 16 setmanes no solament va mostrar disfunció diastòlica en el ventricle esquerre sinò que també va presentar una disminució significativa en la funció sistòlica d'aquest ventricle. Per altre banda, les mesures realitzades en el ventricle dret van mostrar una disminució en la funció diastòlica en els animals sotmesos a exercici a les 8 i a les 16 setmanes.

*Taula 6: Paràmetres ecocardiogràfics en animals sedentaris i exercici a les 8 i a les 16 setmanes. Pc: Pes corporal. DVEd: Diàmetre del ventricle esquerre al final de la diàstole. DVEs: Diàmetre del ventricle esquerre al final de la sístole. IV: Gruix de la paret del septe interventricular. PpVE: Gruix de la paret posterior del ventricle esquerre. FE: Fracció d'Ejecció. Ric: Temps corregit de relaxació isovolumètrica. DVD: Diàmetre del ventricle dret. PIIVD: Gruix de la paret Iliure del ventricle dret. TAPSE: Excursió de l'anell tricuspide durant la sistole. Sm: velocitat de moviment en la paret lateral del ventricle dret. Velocitat E: Pic de velocitat de l'emplenament inicial. E DT: Desacceleració de la ona E. DAEs: Diàmetre de l'aurícula esquerra al final de la sístole. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.* 

		Inicials (Setmana 0)		8 setmanes		16 setmanes		
		Si (n=11)	Ei (n=12)	S8 (n=11)	E8 (n=12)	S16 (n=11)	E16 (n=12)	
Dimensions i funció del VE								
DVEd/Pc	(cm/Kg)	3.01±0.07	3.01±0.05	1.59±0.04	1.72±0.03	1.39±0.05	1.63±0.02*	
DVEs/Pc	(cm/Kg)	1.43±0.07	1.51±0.06	0.79±0.03	0.83±0.03	0.72±0.03	0.94±0.03*	
IV/Pc	(cm/Kg)	0.55±0.01	0.56±0.01	0.31±0.01	0.38±0.01*	0.29±0.01	0.36±0.01*	
PpVE/Pc	(cm/Kg)	0.54±0.01	0.54±0.01	0.30±0.01	0.35±0.01*	0.27±0.01	0.32±0.01*	
Massa VE/	Pc (g/Kg)	2.68±0.11	2.68±0.07	1.93±0.04	2.14±0.05	1.76±0.06	2.13±0.07*	
IV/DVEd		0.19±0.01	0.19±0.00	0.20±0.01	0.22±0.00*	0.21±0.01	0.22±0.01	
FE (%)		86.99±1.45	85.19±1.31	85.74±0.92	85.66±1.02	83.85±1.02	77.89±1.54*	
Ona S	(cm/s)	32.44±1.53	32.71±1.53	33.39±1.48	31.93±1.45	37.06±1.46	30.45±1.20*	
Ric	(ms)	1.21±0.06	1.12±0.07	1.21±0.06	1.43±0.07*	1.29±0.05	1.49±0.06	
Dimensior	ns i funció d	del VD	L	L				
DVD/Pc	(cm/Kg)	1.29±0.03	1.27±0.05	0.68±0.02	0.72±0.03	0.60±0.02	0.69±0.02	
PIIVD/Pc	(cm/Kg)	0.10±0.02	0.11±0.03	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01	
TAPSE	(cm)	3.38±0.68	3.16±0.14	3.41±0.11	3.61±0.09	3.80±0.09	3.43±0.09	
Sm	(cm/s)	8.13±0.68	8.57±0.40	9.42±0.45	9.21±0.47	10.37±0.59	8.99±0.36	
Velocitat E	(cm/s)	75.60±3.51	74.88±2.31	76.61±5.50	60.76±4.27*	63.81±3.63	49.55±3.41	
E DT	(ms)	36.54±1.48	33.15±2.07	34.43±1.39	35.69±3.28	28.49±2.04	44.07±4.31*	
E/A		1.08±0.06	1.20±0.07	1.03±0.05	0.88±0.07	1.03±0.06	0.87±0.05	
Dimensior	ns auricular	rs	·	·				
DAEs/Pc	(cm/Kg)	1.83±0.06	1.87±0.03	0.98±0.03	1.13±0.02*	0.89±0.03	1.14±0.02*	

# 4.1.1.2 Histopatologia i anàlisi del grau de fibrosi

La tinció tricròmica de Masson (Figura 12) (específica per col·lagen) va mostrar un increment en les cèl·lules intersticials amb aparença de fibroblasts i un excés en la deposició de col·lagen al ventricle dret del grup d'animals sotmès a exercici durant 16 setmanes. No es va observar deposició de col·lagen en el ventricle esquerre en cap dels grups experimentals.



*Figura 12: Tricròmica de Masson.* Imatges representatives de talls histològics de ventricle dret dels diferents grups experimental. A: Grups sedentaris. B: Grups exercici. Ampliació x 100. Deposició de col·lagen (blau fletxa).

En la següent figura (Figura 13) es mostren microfotografies representatives del ventricle dret, tenyits amb la tinció de vermell de pricrosirius. Les imatges obtingudes concorden amb les obtingudes per la tinció de Masson. Les imatges mostren una deposició difusa de col·lagen i un desajust en l'arquitectura miocardíaca, sobretot en el ventricle dret dels animals sotmesos a exercici durant 16 setmanes. Aquest patró, no va ser observat en els ventricles esquerres de cap dels grups estudiats.



*Figura 13: Vermell de picrosirius.* Imatges representatives de talls histològics de ventricle dret dels diferents grups experimentals. A: Grups sedentaris. B: Grups exercici Ampliació x 100. La fotografia corresponent al grup exercici de 16 setmanes presenta deposició difusa de col·lagen (vermell, fletxa).

L'anàlisi morfomètric semiquantitatiu de la deposició de col·lagen, va mostrar un increment significatiu al ventricle dret en el grup sotmès a 16 setmanes d'exercici comparat amb el seu grup sedentari. En canvi, la fracció de col·lagen total al septe interventricular i a la paret lliure del ventricle esquerre varen romandre semblants entre els grups sedentari i exercici de tots els temps estudiats (Figura 14).



*Figura 14: Analis morfomètric de la deposició de col·lagen.* VD: ventricle dret. IV: septe interventricular. VE: ventricle esquerre. Els resultats s'expressen com a valor promig  $\pm$  SEM de 4 animals per grup. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

La concentració de la hidroxiprolina (marcador específic de la deposició de col·lagen) es va analtizar als ventricles dret i esquerre (figura 15). Els resultats obtinguts en el ventricle esquerre, no van mostrar diferències significatives entre animals de vida sedentària i animals sotmesos a exercici en cap dels temps d'estudi. En canvi, els resultats obtinguts en el ventricle dret van mostrar un increment significatiu en la concentració d'hidroxiprolina en el grup de 16 setmanes d'exercici en comparació amb el seu grup d'animals sedentaris.



*Figura 15: Determinació dels nivells d'hidroxiprolina*. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen al valor del promig  $\pm$  SEM de 4 animals per al grups sedentari a 4 i 8 setmanes; de 5 animals per als grups exercici de 4 i 8 setmanes; de 6 animals per al grup sedentari a 16 setmanes i de 8 animals per al grup exercici a 16 setmanes. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

#### 4.1.1.3 Immunofluorescència

Per confirmar el procés de remodelat profibròtic en el cor, es va determinar la presència de miofibroblasts amb el marcatge contra l'anticòs  $\alpha$ -SMA. Aquesta tinció es va realitzar únicament en els grups d'animals de 16 setmanes ja que és el temps d'estudi en el que es va observar la presència de remodelat fibròtic. Els miofibroblasts són un tipus de fibroblasts diferenciats, que es caracteritzen principalment per presentar una aparença mixta amb propietats de fibroblast i de cèl·lula de la musculatura llisa. En gran part, la seva importància radica en que tenen una major capacitat per sintetitzar col·lagen. Per tant, es troben en zones on s'estan produint processos de lesió i reparació. Donat que l'anticòs  $\alpha$ -SMA és específic per els filaments d'actina de la musculatura llisa, també s'observa un marcatge positiu en les cèl·lules de la musculatura llisa dels vasos sanguinis. La tinció contra l'anticòs  $\alpha$ -SMA va mostrar la presència de miofibroblasts a l'espai intersticial dels ventricles drets únicament en els animals que havien realitzat exercici (Figura 16).



Figura 16: Immunofluorescència de talls histològics del ventricle dret dels grups sedentari i exercici a 16 setmanes. Ampliació x 400. Marcatge d' $\alpha$ -SMA (verd) i contratinció dels nuclis amb iodur de propidi (vermell).

#### 4.1.2. Anàlisi de l'expressió d'mRNA

L'expressió de TGF-β1, Fibronectina-1, MMP2, TIMP1, Procol·lagen-I i Procol·lagen-III, es va mesurar en cada una de les cambres del cor, en animals sedentaris i en animals sotmesos a exercici, en tots els temps d'estudi. En general, comparant els grups sedentaris i exercici, cap d'aquests marcadors va presentar diferències significatives en la seva expressió fins arribar al temps d'estudi de 16 setmanes.

Després de 16 setmanes d'exercici intens, l'expressió d'mRNA del TGF- $\beta$ 1 va mostrar un increment significatiu comparat amb el seu corresponent grup control tant a les aurícules com en el ventricle dret (Figura 17).



Figura 17: Expressió d'mRNA del TGF- $\beta$ 1 a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerre. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen al valor promig  $\pm$  SEM de 4 animals per al grups sedentari a 4 i 8 setmanes; de 5 animals per als grups exercici de 4 i 8 setmanes; de 6 animals per al grup sedentari a 16 setmanes i de 8 animals per al grup exercici a 16 setmanes. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

L'expressió de Fibronectina-1 s'incrementa a les 8 setmanes d'exercici, de totes maneres no s'observen diferències significatives fins a les 16 setmanes d'exercici (Figura 18). L'expressió d'mRNA de Fibronectina-1, va mostrar un increment significatiu en el grup experimental de 16 setmanes d'exercici, tant en l'aurícula detra com en el ventricle dret.



Figura 18: Expressió d'mRNA de la Fibronectina-1 a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen al valor promig  $\pm$  SEM de 4 animals per al grups sedentari a 4 i 8 setmanes; de 5 animals per als grups exercici de 4 i 8 setmanes; de 6 animals per al grup sedentari a 16 setmanes i de 8 animals per al grup exercici a 16 setmanes. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

L'expressió de la MMP-2 va augmentar significativament a l'aurícula dreta, l'esquerra i al ventricle dret en els animals del grup de 16 setmanes d'exercici en comparació amb el seu grup sedentari (Figura 19).



Figura 19: Expressió d'mRNA de la MMP-2 a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen al valor promig  $\pm$  SEM de 4 animals per al grups sedentari a 4 i 8 setmanes; de 5 animals per als grups exercici de 4 i 8 setmanes; de 6 animals per al grup sedentari a 16 setmanes i de 8 animals per al grup exercici vs grup sedentari.

L'expressió d'mRNA corresponent al TIMP-1, només va mostrar un increment significatiu en el ventricle dret del grup d'animals sotmesos a exercici durant 16 setmanes, en comparació amb el seu corresponent grup control (Figura 20).



Figura 20: Expressió d'mRNA del TIMP-1 a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen al valor promig  $\pm$  SEM de 4 animals per al grups sedentari a 4 i 8 setmanes; de 5 animals per als grups exercici de 4 i 8 setmanes; de 6 animals per al grup sedentari a 16 setmanes i de 8 animals per al grup exercici vs grup sedentari.

Finalment, pel que fa a l'expressió d'mRNA dels procol·làgens, es va observar un increment significatiu del procol·lagen-I tant a l'aurícula dreta com en el ventricle dret dels animals sotmesos a exercici durant 16 setmanes (Figura 21).



Figura 21: Expressió d'mRNA de Procol·lagen-I a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen al valorpromig  $\pm$  SEM de 4 animals per al grups sedentari a 4 i 8 setmanes; de 5 animals per als grups exercici de 4 i 8 setmanes; de 6 animals per al grup sedentari a 16 setmanes i de 8 animals per al grup exercici vs grup sedentari.

L'expressió d'mRNA del procol·lagen-III va mostrar diferències significatives únicament a l'aurícula dreta dels animals sotmesos a 16 setmanes d'exercici (Figura 22).



Figura 22: Expressió d'mRNA del Procol·lagen-III a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen al valor promig  $\pm$  SEM de 4 animals per al grups sedentari a 4 i 8 setmanes; de 5 animals per als grups exercici de 4 i 8 setmanes; de 6 animals per al grup sedentari a 16 setmanes i de 8 animals per al grup exercici a 16 setmanes. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

## 4.1. 3. Anàlisis de Proteïnes per Western-Blot

Per confirmar si els canvis obtinguts en l'expressió d'mRNA corresponien amb els nivells de síntesi proteica, es va mesurar per Western-Blot la quantitat de proteïna de TGF-β1, Fibronectina-1, MMP-2, TIMP-1, Col·lagen-I i Col·lagen-III en el miocardi de les diferents cambres del cor. Aquestes determinacions només es analitzar en els grups sedentari i esport a les 16 setmanes, ja que és el temps d'estudi on es van obtenir canvis en l'expressió de mRNA.

La determinació dels nivells proteics de TGF-β1 va mostrar un increment significatiu en l'aurícula dreta, en l'esquerra i en el ventricle dret del grup d'animals sotmesos a exercici en comparació amb els animals de vida sedentària (Figura 23). En canvi, els nivells de la la quantitat de proteina de Fibronectina-1 no van mostrar diferències significatives entre els grups experimentals en cap de les cavitats (Figura 23).



Figura 23: Nivells d'expressió proteica de TGF- $\beta$ 1 l Fibronectina-1 dels grups sedentari i exercici a 16 setmanes normalitzats per expressió de  $\beta$ -actina, en cada una de les quatre cambres cardíaques. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats estan expressats per valor promig  $\pm$  SEM de 6 animals per al grup sedentari i 8 animals per al grup control. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

La quantitat de proteïna mesurada per la MMP2 va ser significativament més elevada a les aurícules dels animals sotmesos a exercici, en comparanció amb els del grup sedentari (Figura 24). Tanmateix, l'expressió del seu inhibidor (TIMP-1) no va mostrar diferències significatives en cap de les cavitats (Figura 24).



Figura 24: Nivells d'expressió proteica de la MMP-2 i el TIMP-1 dels grups sedentari i exercici a 16 setmanes normalitzats per expressió de  $\beta$ -actina, en cada una de les quatre cambres cardíaques. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats estan expressats per valor promig  $\pm$  SEM de 6 animals per al grup sedentari i 8 animals per al grup control. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

Finalment, els nivells proteics dels col·làgens mostren, pel col·lagen-I, un increment significatiu en el teixit corresponent a les aurícules i el ventricle dret d'animals del grup d'exercici comparant amb els resultats obtinguts en el grup sedentari. En canvi, per al col·lagen-III no es van observar diferències en cap de les cavitats estudiades, entre els animals d'exercici i els sedentaris (Figura 25).



Figura 25: Nivells d'expressió proteica de Col·lagen-I i Col·lagen-III dels grups sedentari i exercici a 16 setmanes normalitzats per expressió de  $\beta$ -actina, en cada una de les quatre cambres cardíaques. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre.Els resultats estan expressats per valor promig  $\pm$  SEM de 6 animals per al grup sedentari i 8 animals per al grup control. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.

#### 4.1.4. Canvis en la conducció elèctrica: remodelat elèctric

Aquest estudi només es va realitzar a les 16 setmanes ja que és el temps d'estudi en el que es va observar la presència de remodelat fibròtic. Per mesurar la conductivitat del cor i la susceptibilitat a l'inducció d'arítmies es va introduir un catèter especialment dissenyat a l'àpex del ventricle dret. En els animals sotmesos a exercici es va detectar un lleuger retard en la conducció ventricular. Això es va poder observar per l'augment en la durada del fragment QRS (Taula 7). En canvi, el període refractari efectiu obtingut indica que no es van produir canvis en la repolarització (Taula 7).

*Taula 7: Paràmetres electrofisiològics del ventricle dret als grups sedentari i exercici a* **16 setmanes.** *PRVE: periòde refractari ventricular efectiu. Els resultats estan expressats per valor promig*  $\pm$  *SEM de 10 animals per al grup sedentari i 11 per al grup exercici. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari.* 

		Sedentari (n=10)	Exercici (n=11)
Durada fragment QRS	(ms)	$23.5\pm0.4$	$25.2 \pm 0.6^{\textbf{*}}$
Durada de l'ECG ventricular	(ms)	17.1 ± 0.5	$18.2\pm0.6$
PRVE	(ms)	$39.8 \pm 1.1$	$43.2\pm1.3$

Per altre banda, durant l'estimulació ventricular programada, es va aconseguir induir una arítmia sostinguda en un 42% dels animals sotmesos a exercici, mentre que en els animals sedentaris només es va poder induir en un 6% (Figura 26).



*Figura 26: Conducció elèctrica* A) Inducció d'arítmies sostingudes (>10s) per estimulació elèctrica en animals sedentaris i exercici. B) Exemple de la gràfica de la arítmia ventricular polimòrfica obtinguda en una estimulació a un animal sotmès a exercici.

4.2. ESTUDI 2: AVALUACIÓ DE LA REVERSIÓ DE LA FIBROSI CARDÍACA INDUÏDA PER EXERCICI.

En aquest estudi es va avaluar si aturar la rutina diària d'exercici podria revertir el procés fibrotic induït per l'exercici. El disseny experimental va incloure diferents temps d'estudi, concretament 2, 4 i 8 setmanes de repòs després de 16 setmanes d'exercici.

## 4.2.1 Hipertròfia

El pes corporal, el pes del cor, i la proporció entre el pes del cor i el pes corporal en el moment del sacrifici, estan resumits en la taula 8. Els animals que van realitzar exercici van mostrar una disminució significativa en el pes corporal en comparació amb els animals sedentaris en tots els temps estudiats. Aquestes diferències es van observar en el grup d'animals d'exercici i en els grups d'animals que després de 16 setmanes d'exercici van passar per un periode de repòs. No obstant, el pes corporal va mostrar diferències significatives entre el grup d'animals d'exercici i els grups d'animals de repos de 4 i de 8 setmanes. Aquests resultats indiquen que el pes corporal es restableix després d'un temps de repòs.

*Taula 8: Pes corporal, pes del cor i proporció entre pes del cor/pes corporal.* Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 4 animals en el cas de tots els grups sedentaris, i de 8 animals en el cas dels grups de 16 setmanes d'exercici i els diferents grups de reversibilitat. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p<0.05 grups de repòs vs grup exercici.

					Pes del cor/
			Pes corporal (g)	Pes del cor (g)	Pes corporal
16 setmanes					(x1000)
To setmence	S	(n=4)	$453.67 \pm 4.91$	$1.03\pm0.07$	$\textbf{2.26} \pm \textbf{0.15}$
	Е	(n=8)	$363.00 \pm 8.13^{*}$	$1.17\pm0.02$	$3.22\pm0.09^{\star}$
2 setmanes de	S18	(n=4)	$469.00 \pm 19.60$	$0.99 \pm 0.02$	$\textbf{2.12}\pm\textbf{0.04}$
repòs	R2	(n=8)	$372.30 \pm 14.94^{*}$	$1.05\pm0.03$	$\textbf{2.89} \pm \textbf{0.09}\text{*}\text{\#}$
4 setmanes de	S20	(n=4)	$496.50\pm6.94$	$1.07\pm0.01$	$\textbf{2.15}\pm0.01$
repòs	R4	(n=8)	412.00 ± 17.82*#	$1.06\pm0.04$	$\textbf{2.62} \pm \textbf{0.04*\#}$
8 setmanes de	S24	(n=4)	$538.00 \pm 1.63$	$1.17\pm0.03$	$\textbf{2.17} \pm \textbf{0.06}$
repòs	R8	(n=8)	429.71 ± 15.69*#	1.11 ± 0.02	2.60 ± 0.11*#

El pes del cor no va mostrar diferències entre cap dels grups experimentals. En canvi, la proporció entre el pes del cor en relació al pes corporal va mostrar diferencies significatives entre el grup sedentari i l'exercici, així com també entre el grup sedentari i els grups exercici + repós en tots els temps estudiats. A més, aquesta proporció també va presentar diferències significatives entre el grup d'animals sotmesos a exercici i tots els grups d'exercici + repós. Aquestes diferències indiquen que després d'un temps de repòs els canvis induïts per l'exercici comencen a revertir.

Degut a que els diferents grups d'animals sedentaris (S, S18, S20 i S24) no van mostrar diferències entre ells en cap d'aquests paràmetres estudiats, d'ara en endavant es considerarà els animals de vida sedentària com a un únic grup d'estudi.

La determinació del gruix de la paret ventricular dreta no va mostrar diferències significatives entre cap grup d'estudi. En canvi, les mesures del gruix de la paret del septe interventricular i de la paret lliure del ventricle esquerre, van mostrar un increment significatiu en els grups exercici i repòs de 2 setmanes respecte el grup sedentari. El resultats obtinguts en els grups de 4 i 8 setmanes de repòs mostren valors similars als obtinguts en els grups sedentaris. Aquests resultats indiquen que desprès d'un període de repòs té lloc un procés de reversió de la hipertròfia (Figura 27).



*Figura 27: Gruix de les parets ventriculars normalitzats per el pes corporal*. VD: ventricle dret. IV: septe interventricular. VE: ventricle esquerre. Els valors corresponen al valor promig  $\pm$  SEM de 3 animals per cada grup \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p < 0.05 grup repòs vs grup exercici.

# 4.2.2. Histopatologia i anàlisi del grau de fibrosi

Les tincions tricròmica de Masson i de vermell de Picrosirius van mostrar un excés en la deposició de col·lagen en el grup exercici en comparació amb el grup sedentari. El tractament amb Losartan va prevenir l'acumulació de col·lagen (Figura 28).



*Figura 28: Tricròmica de Masson i Vermell de picrosirius.* A la part superior, imatges representatives de talls histològics de ventricle dret tenyits amb la tricròmica de Masson. A la part inferior, imatges representatives de talls histològics de ventricle dret tenyits amb vermell de picrosirius. S: Sedentari, E: Exercici 16 stmanes, R2: Repòs 2 setmanes, R4: Repòs 4 setmanes, R8: Repòs 8 setmanes. Ampliació x100. Les fletxes indiquen els llocs on es dóna un increment en la deposició de col·lagen.

L'anàlisi morfomètric semiquantitatiu de la deposició de col·lagen va confirmar un increment significatiu en la deposició de col·lagen en el ventricle dret del grup sotmès a exercici, en comparació amb el grup sedentari, i una parcial regressió en els diferents grups de reversibilitat (Figura 29).



*Figura 29: Anàlisi quantitatiu de la deposició de col·lagen.* VD: ventricle dret. IV: septe interventriculaR. VE: ventricle esquerre. Els resultats s'expressen com a valor promig  $\pm$  SEM de 3 animals per a cada grup experimental.\* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p < 0.05 grup repòs vs grup exercici.

La determinació dels nivells d'hidroxiprolina va mostrar un increment significatiu en el grup d'animals sotmesos a exercici i els grups de repòs de 2 i 4 setmanes respecte el grup sedentari. A les 8 setmanes de repòs els nivells d'hidroxiprolina van retornar a nivells basals (Figura 30).



*Figura 30: Nivells d'hidroxiprolina en els diferents grups experimentals.* VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 4 animals en el grups sedentari, i de 8 animals en el cas dels grups de 16 setmanes d'exercici i els diferents grups de reversibilitat. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p<0.05 grups de repòs vs grup exercici.

Per confirmar el procés de reversió de la fibrosis, es va determinar la presència de miofibroblasts amb el marcatge contra l'anticos  $\alpha$ -SMA. La tinció contra l'anticos  $\alpha$ -SMA va mostra una presència de miofibroblasts en el grup exercici i la seva presència va anar disminuint en funció del període de temps de repòs. (Figura 31).



Figura 31: Immunofluorescència per  $\alpha$ -SMA de talls histològics de ventricle dret dels diferents grups experimentals. S: Sedentari, E: Exercici 16 stmanes, R2: Repòs 2 setmanes, R4: Repòs 4 setmanes, R8: Repòs 8 setmanes. Ampliacions x100 imatges de la part superior. Ampliacions x630, imatges de la part inferior.  $\alpha$ -SMA (verd), contratinció dels nuclis amb iodur de propidi (vermell).

#### 4.2.3. Anàlisi de l'expressió d'mRNA

L'expressió de TGF-β1, Fibronectina-1, MMP2, TIMP1, Procol·lagen-I i Procol·lagen-III, es va mesurar en cada una de les cambres del cor, en animals sedentaris, en animals sotmesos a exercici i en els animals de repòs (2, 4 i 8 setmanes).

L'expressió d'mRNA de TGF-β1 va mostrar un increment significatiu a les aurícules i al ventricle dret dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 32). L'expressió d'mRNA de TGF-β1 en els animals dels grups de repòs van mostrar una disminució significativa respecte els animals del grup d'exercici, retornant a valors basals (Figura 32).



Figura 32: Expressió d'mRNA del TGF- $\beta$ 1 a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 4 animals en el grups sedentari, i de 8 animals en el cas dels grups de 16 setmanes d'exercici i els diferents grups de repòs. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p<0.05 grups de repòs vs grup exercici.

L'expressió de Fibronectina-1 va mostrar un increment significatiu a l'aurícula dreta i el ventricle dret dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 33). L'expressió d'mRNA de Fibronectina-1 en els animals dels grups de repòs van mostrar una disminució significativa respecte els animals del grup d'exercici, retornant a valors basals (Figura 33).



Figura 33: Expressió d'mRNA de la Fibronectina-1 a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 4 animals en el grups sedentari, i de 8 animals en el cas dels grups de 16 setmanes d'exercici i els diferents grups de repòs. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p<0.05 grups de repòs vs grup exercici

L'expressió de MMP-2 va mostrar un increment significatiu a l'aurícula dreta i el ventricle dret dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 34). L'expressió d'mRNA de MMP-2 en els animals dels grups de repòs van mostrar una disminució significativa respecte els animals del grup d'exercici, retornant a valors basals (Figura 34).



Figura 34: Expressió d'mRNA de la MMP-2 a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 4 animals en el grups sedentari, i de 8 animals en el cas dels grups de 16 setmanes d'exercici i els diferents grups de repòs. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p<0.05 grups de repòs vs grup exercici.

L'expressió d'mRNA corresponent al TIMP-1, no va mostrar cap diferencia significativa entre els diferents grups experimentals (Figura 35).



Figura 35: Expressió d'mRNA del TIMP a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 4 animals en el grups sedentari, i de 8 animals en el cas dels grups de 16 setmanes d'exercici i els diferents grups de repòs. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p<0.05 grups de repòs vs grup exercici

L'expressió d'mRNA del procol·lagen-I va mostrar un increment significatiu a l'aurícula dreta i el ventricle dret dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 36). L'expressió d'mRNA del procol·lagen-I en els animals dels grups de repòs van mostrar una disminució significativa respecte els animals del grup d'exercici, retornant a valors basals (Figura 36).



Figura 36: Expressió d'mRNA del Procol·lagen-l a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 4 animals en el grups sedentari, i de 8 animals en el cas dels grups de 16 setmanes d'exercici i els diferents grups de repòs. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p<0.05 grups de repòs vs grup exercici.

L'expressió d'mRNA del procol·lagen-III va mostrar un increment significatiu a l'aurícula dreta dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 37). L'expressió d'mRNA del procol·lagen-III en els animals dels grups de repòs van mostrar una disminució significativa respecte els animals del grup d'exercici, retornant a valors basals (Figura 37).



Figura 37: Expressió d'mRNA de Procol·lagen-III a les quatre cambres cardíaques als diferents temps d'estudi, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 4 animals en el grups sedentari, i de 8 animals en el cas dels grups de 16 setmanes d'exercici i els diferents grups de reversibilitat. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. # p<0.05 grups de reversibilitat vs grup exercici.

# 4.3. ESTUDI 3: EFECTE DEL LOSARTAN EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA FIBROSI CARDÍACA

En aquest estudi es va evaluar la possible prevenció del proces fibrotic induït per l'exercici mitjançant l'administració d'un inhibidor del receptor AT-1 de l'angiotensina-II.

# 4.3.1 Hipertròfia cardíaca

Igual que s'ha observat en els estudis anteriors, l'exercici va provocar una disminució en el pes corporal. Aquesta pèrdua de pes va mostrar diferències significatives entre el grup d'animals exercici i el grup sedentari. El tractament amb Losartan no va ser capaç de modificar aquesta pèrdua de pes (Taula 9). Els pesos del cor no van mostrar diferències significatives entre els diferents grups experimentals (Taula 9). No obstant, la proporció entre el pes del cor en relació al pes corporal, va mostrar diferències significatives entre els grups d'exercici i exercici + Losartan en comparació amb els seus respectius grups d'animals sedentaris (Taula 9).

*Taula 9: Pes corporal, pes del cor i proporció entre pes del cor/pes corporal.* Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 3 animals en els grups sedentari i sedentari + Losartan i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

			Per del cor/
	Pes corporal	Pes del cor	Pes corporal (x1000)
Sedentari (n=3)	414.8 ± 13.98	1.027 ± 0.090	$\textbf{2.44} \pm \textbf{0.09}$
Sedentari + Losartan (n=3)	382.5 ± 17.97	0.940 ± 0.090	$2.45\pm0.25$
Exercici (n=4)	357.1 ± 8.25 *	1.118 ± 0.050	$3.08 \pm 0.06$ *
Exercici + Losartan (n=4)	339.7 ± 8.96 \$	1.025 ± 0.042	$3.12 \pm 0.04$ \$

La determinació del gruix de la paret ventricular dreta no va mostrar diferències significatives entre cap dels grups d'estudi. Els grups d'exercici i d'exercici + Losartan van mostrar un increment significatiu en els gruixos del septe interventricular i de la paret lliure del ventricle esquerre en comparació amb els seus respectius grups sedentaris (Figura 38). No obstant, el grup tractat amb Losartan va mostrar una reducció significativa del gruix de la paret lliure del ventricle esquerre en comparació amb el sequerre en comparació amb el grup d'exercici no tractat (Figura 38).



*Figura 38: Gruixos de les parets ventriculars normalitzats per el pes corporal.* VD: ventricle dret. IV: septe interventricular. VE: ventricle esquerre. Els valors corresponen al valor promig  $\pm$  SEM de 2 animals per a als grups sedentaris i exercici; i de 3 animals per als grups sedentari + Losartan i exercici + Losartan de 16 setmanes. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan; i , # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

#### 4.3.2. Histopatologia

Les tincions tricròmica de Masson i de vermell de Picrosirius van mostrar un excés en la deposició de col·lagen en el grup exercici en comparació amb el grup sedentari. En el grup exercici + Losartan es va prevenir aquesta acumulació de col·lagen (Figura 39).



*Figura 39: Tricròmica de Masson i Vermell de Pircrosirius dels diferents grups experimentals. S:* Sedentari, *S* + LOS: Sedentari + Losartan, *E:* Exercici, *E* + LOS: Exercici + Losartan. A) Imatges representatives de talls histològics de ventricle dret tenyides amb la tricròmica de Masson. B) Imatges representatives de talls histològics de ventricle dret tenyides amb vermell de picrosirius. Ampliació x100. Les fletxes indiquen un increment en la deposició de col·lagen.

## 3.3. Anàlisi de la expressió d'mRNA

L'expressió de TGF-β1, Fibronectina-1, MMP2, TIMP1, Procol·lagen-I i Procol·lagen-III, es va mesurar en cada una de les cambres del cor, en els grups d'animals sedentari i d'exercici tractats amb Losartan i sense tractar.

L'expressió d'mRNA del TGF-β1 va mostrar un increment significatiu a l'aurícula dreta i el ventricle dret dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 32). L'expressió d'mRNA del TGF-β1 en el grup d'exercici tractat amb Losartan va mostrar uns valors significativament menors respecte els animals del grup d'exercici. El tractament amb Losartan va ser capaç de prevenir el increment de l'expressió de TGF-β1 provocat per l'exercici intens i continuat (Figura 40).



*Figura 40: Expressió d'mRNA del TGF-β1 a les quatre cambres cardíaque, normalitzat per β-actina.* AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan; i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

L'expressió de Fibronectina-1 va mostrar un increment significatiu a l'aurícula dreta i al ventricle dret dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 41). L'expressió d'mRNA de Fibronectina-1 en el grup d'exercici tractat amb Losartan va mostrar uns valors significativament menors respecte els animals del grup d'exercici no tractats. El tractament amb Losartan va ser capaç de prevenir l'increment de l'expressió de Fibronectina-1 provocat per l'exercici intens i continuat (Figura 41).



Figura 41: Expressió d'mRNA de la Fibronectina-1 a les quatre cambres cardíaques normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan; i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

L'expressió de la MMP-2 va mostrar un increment significatiu a l'aurícula dreta i al ventricle dret dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 42). L'expressió d'mRNA de la MMP-2 en el grup d'exercici tractat amb Losartan va mostrar uns valors significativament menors respecte els animals del grup d'exercici no tractats. El tractament amb Losartan va ser capaç de prevenir l'increment de l'expressió de la MMP-2 provocat per l'exercici intens i continuat (Figura 42).



Figura 42: Expressió d'mRNA de la MMP-2 a les quatre cambres cardíaques normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan; i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

L'expressió d'mRNA corresponent a l'inhibidor TIMP-1 només va mostrar un increment significatiu en la seva expressió en el ventricle dret del grup d'animals d'exercici comparat amb el seu grup control. Aquest increment en l'expressió no es va produir en el grup d'exercici tractat amb Losartan, indicant l'efectivitat d'aquest tractament en la prevenció dels increments d'expressió provocats per l'exercici (Figura 43).


Figura 43: Expressió d'mRNA del TIMP-1 a les quatre cambres cardíaques, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan; i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

L'expressió d'mRNA del procol·lagen-I va mostrar un increment significatiu a l'aurícula dreta i esquerra dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 44). L'expressió d'mRNA del procol·lagen-I en els animals del grup d'exercici tractat amb Losartan va mostrar una disminució respecte els animals del grup d'exercici, encara que només va ser estadísticament significativa a l'aurícula dreta. De totes maneres, el grup d'exercici tractat amb Losartan no van mostrar en cap cas un increment significatiu respecte als grups sedentaris. (Figura 44).



Figura 44: Expressió d'mRNA del Procol·lagen-I a les quatre cambres cardíaques, normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan; i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

L'expressió d'mRNA del procol·lagen-III va mostrar un increment significatiu a l'aurícula dreta dels animals d'exercici comparat amb el grup sedentari (Figura 37). L'expressió d'mRNA del procol·lagen-III en els animals del grup d'exercici tractat amb Losartan va mostrar una expressió significativament menor respecte els animals del grup d'exercici. Per tant, el tractament amb Losartan va ser capaç de prevenir el increment de l'expressió del procol·lagen-III provocat per l'exercici intens i continuat (Figura 45).



Figura 45: Expressió d'mRNA del Procol·lagen-III a les quatre cambres cardíaques normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan; i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

#### 3.4. Anàlisis de Proteïnes per Western-Blot

Per confirmar si els canvis obtinguts en l'expressió d'mRNA corresponien amb els nivells de síntesi proteica, es va mesurar per Western-Blot la quantitat de proteïna de TGF-β1, Fibronectina-1, MMP-2, TIMP-1, Col·lagen-I i Col·lagen-III en el miocardi de les diferents cambres del cor. Corroborant els resultats d'expressió de mRNA obtinguts per RT-PCR, després de 16 setmanes d'exercici, es va obtenir un increment significatiu en els nivells proteics de TGF-β1 tant en la aurícula dreta, com en l'esquerra i també en el ventricle dret del grup d'animals sotmesos a exercici en comparació amb els animals de vida sedentària (Figura 46). El tractament amb Losartan va ser capaç de prevenir aquests increments (Figura 46).



**Figura 46:** Nivells d'expressió proteica pel TGF- $\beta$ 1 normalitzat per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari; \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan i # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan

Corroborant els resultats d'expressió de mRNA obtinguts per RT-PCR, després de 16 setmanes d'exercici, es va obtenir un increment significatiu en els nivells proteics de Fibronectina-1 tant en la aurícula dreta, com en el ventricle dret del grup d'animals sotmesos a exercici en comparació amb els animals de vida sedentària. El tractament amb Losartan va ser capaç de prevenir aquest increment (Figura 47)



Figura 47: Nivells d'expressió proteica de Fibronectina-1 normalitzada per  $\beta$ -actina. AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig ± SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari; \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan i # p < 0.05exercici vs exercici + Losartan.

La quantitat de proteïna mesurada per a la MMP2 va ser significativament més elevada en l'aurícula dreta dels animals sotmesos a exercici comparant amb el grup sedentari (Figura 48). El tractament amb Losartan va ser capaç de prevenir aquest increment. A més, el grup d'exercici tractat amb Losartan també va mostrar una disminució significativa en els nivells de proteïna en el ventricle dret respecte el grup d'exercici no tractat. (Figura 48)



*Figura 48: Nivells d'expressió proteica de MMP-2 normalitzats per β-actina.* AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. #p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

La quantitat de proteïna mesurada pel TIMP-1 va ser significativament més elevada en les aurícules i el ventricle dret del grup d'animals sotmesos a exercici comparant amb el grup sedentari (Figura 49). El tractament amb Losartan va ser capaç de prevenir aquest increment (Figura 49).



*Figura 49: Nivells d'expressió proteica de TIMP-1 normalitzats per β-actina.* AD: aurícula dreta. AE: aurícula esquerra. VD: ventricle dret. VE: ventricle esquerre. Els resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. #p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

Finalment, els nivells proteics dels col·làgens mostren, per al col·lagen-I, un increment significatiu l'aurícula dreta del grup d'animals sotmesos a exercici comparant amb el grup sedentari. El tractament amb Losartan va ser capaç de prevenir aquest increment (Figura 50).



*Figura 50: Nivells d'expressió proteica de Col·lagen-I normalitzats per β-actina*. *AD:* aurícula dreta. *AE:* aurícula esquerra. *VD:* ventricle dret. *VE:* ventricle esquerre. *Els resultats* corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan

Els nivells d'expressió per al col·lagenIII van mostrar un increment significatiu a l'aurícula esquerra i al ventricle dret dels animals sotmesos a exercici en comparació amb el grup d'animals de vida sedentària. El tractament amb Losartan va prevenir aquests increments. A més, els nivells de proteïna a l'aurícula dreta del grup d'exercici tractat amb Losartan va mostrar una disminució significativa en comparació amb els nivells de proteïna del grup d'exercici no tractat (Figura 51).



*Figura 50: Nivells d'expressió proteica de Col·lagen-l normalitzats per β-actina*. *AD:* aurícula dreta. *AE:* aurícula esquerra. *VD:* ventricle dret. *VE:* ventricle esquerre. *Els* resultats corresponen a valors promig  $\pm$  SEM de 3 animals en el cas dels grups sedentari i sedentari + Losartan i de 4 animals en el cas dels grups exercici i exercici + Losartan. \* p < 0.05 grup exercici vs grup sedentari. \$ p < 0.05 sedentari + Losartan vs exercici + Losartan. # p < 0.05 exercici vs exercici + Losartan.

# DISCUSSIÓ

#### 5. DISCUSSIÓ

Una llegenda de l'antiga Grècia diu que Filípides va córrer 250 Km en dos dies per sol·licitar ajuda als espartans quan Atenes estava sent envaïda. Més tard, quan se li va encomanar córrer cap Atenes per declarar la victòria dels grecs davant els perses, en la batalla de Marató, després de córrer els 25 Km que separaven les dues poblacions, es va desplomar i va caure mort. Es podria hipotetitzar que patia algun tipus d'anomalia en les artèries coronàries, que va tenir un accident cerebral, o sofria alguna mena de cardiomiopatia ventricular congènita, com passa en alguns atletes de la regió del Veneto (<sup>248</sup>). En l'actualitat, es sap que l'exercici crònic indueix canvis hemodinàmics que alteren les condicions de càrrega del cor i generen adaptacions estructurals (<sup>77;79;108</sup>).

Generalment, aquests canvis estructurals han estat considerats avantatjosos, no perjudicials, i formen part del conjunt d'adaptacions del cor a l'exercici que s'engloben en el cor d'atleta (<sup>80;83;108</sup>). No obstant, existeix la necessitat d'establir models animals per tal d'avaluar l'efecte de practicar diferents modalitats d'exercici d'alt rendiment a llarg termini, donada la seva creixent popularitat (<sup>249</sup>) i la seva possible associació amb el risc de patir repetides lesions cardiovasculars i arítmies (<sup>14;16;250</sup>). En l'actualitat existeix un creixent interès en saber si l'exercici és el culpable de les morts sobtades de futbolistes i altres esportistes d'èlit que han aparegut últimament en diferents medis de comunicació. Donar resposta a les preguntes que es plantegen sobre els riscs associats a l'exercici, és necessari no només per garantir la seguretat dels atletes sinó també per a protegir la reputació de l'exercici com una de les intervencions més eficaces pel bé de la salut (<sup>5:8;73;251</sup>).

Aquest treball descriu un model d'exercici crònic en animals i demostra l'existència d'una relació entre la pràctica d'exercici intens i perllongat en el temps amb la presència de processos de remodelat per fibrosi en diverses regions del cor.

El model establert es va dissenyar per avaluar la naturalesa dels canvis induïts per l'exercici en el cor, seguint la seva evolució al llarg del temps. Per fer-ho, es va programar l'entrenament de resistència en diferents temps d'estudi (4, 8 i 16 setmanes). A partir de les 8 setmanes d'entrenament és quan es van començar a observar canvis significatius en els paràmetres estudiats. De totes maneres, els canvis més importants no es van observar fins a les 16 setmanes d'exercici. Per això, les 16 setmanes d'exercici ha estat el temps d'estudi escollit en la majoria dels experiments realitzats en aquest treball. Després de 16 setmanes d'exercici intens, es

van observar canvis en la morfologia i funció cardíaca. A més també es van observar diferencies en el contingut fibrós del teixit, un increment en l'expressió de diferents marcadors de fibrosi i una major susceptibilitat a la arítmia. En conjunt, tot això suggereix que l'exercici crònic pot promoure la remodelació en el teixit cardíac i facilitar l'aparició d'arítmies.

Els nostres resultats mostren un increment significatiu en el gruix de les parets del ventricle esquerre a partir de les 8 setmanes d'exercici intens. A més, la massa cardíaca total va ser significativament major en tots els temps d'estudi. L'avaluació dels talls histològics no va mostrar signes d'edema ni d'infiltració de cèl·lules inflamatòries. En canvi, es va obserbar un augment en la mida dels miocits. Per tant, l'increment en el pes del teixit es podria atribuir a aquest augment en la mida dels miòcits. A més, a les 16 setmanes es va mesurar individualment la massa del teixit de cada una de les cambres cardíaques i en tots els casos van mostrar un increment significatiu respecte a les cambres del grup sedentari. Aquests resultats coincideixen amb els descrits en altres estudis experimentals que utilitzen models animals d'exercici similars al nostre i també observen un increment en la massa de les cavitats cardíaques (<sup>232;236</sup>). Tot plegat indica que el protocol d'exercici establert en aquest treball indueix el desenvolupament d'hipertròfia associada a l'exercici.

Per confirmar el desenvolupament d'hipertròfia cardíaca, es van mesurar les dimensions de les cavitats i el gruix de les parets cardíaques per ecocardiografia. El grup d'animals que va realitzar exercici durant 16 setmanes, presentava una marcada dilatació en la llum del ventricle esquerre. En conjunt amb l'increment en el gruix de la paret del ventricle esquerre, aquests resultats indiquen que com a conseqüència de la pràctica intensa d'exercici, es va produir un procés d'hipertròfia eccèntrica (<sup>252;253</sup>). L'hipertròfia eccèntrica és un esdeveniment freqüent en esportistes que realitzen activitats de resistència aeròbiques, com curses de marató, triatlons, ciclisme, etcètera, ja que forma part del conjunt d'adaptacions del cor d'atleta. Per tant, que els nostres animals de 16 setmanes d'exercici hagin desenvolupat hipertròfia eccèntrica comfirma la utilitat d'aquest model experimental com a eina per l'estudi dels canvis en el cor provocats per una pràctica extrema d'exercici.

Mitjançant aquest model hem observat que 16 setmanes d'exercici provoquen disfunció diastòlica en el ventricle dret amb una tendència a la dilatació. Aquests resultats també han estat reçentment descrits en esportistes de resistència d'alt nivell (<sup>250</sup>). A més, pel que fa al ventricle esquerre, hi ha un estudi que descriu que 12 setmanes de *jogging* són suficients per induir un increment en el gruix de la paret

ventricular esquerra en individus prèviament sedentaris (<sup>254</sup>). Els nostres resultats coincideixen amb els que han obtingut en aquest estudi ja que a partir de les 8 setmanes d'exercici també hem observat signes hipertròfia i disfunció en el ventricle esquerre, conjuntament amb la dilatació de l'aurícula esquerra. Tots aquests resultats demostren que l'exercici intens i continuat provoca canvis estructurals que podrien distorsionar la funció cardíaca.

Al llarg dels estudis realitzats en la present tesi doctoral, s'ha avaluat la hipòtesi inicial de que l'exercici intens provoca un seguit de càrregues de pressió i volum que poden causar petites lesions cardíagues. L'acúmul d'aquestes lesions provocades per l'exercici, amb el pas del temps, podrien induir respostes maladaptatives com el remodelat i la fibrosi. Els procesos de remodelat i fibrosi poden conduir a una posterior disfunció del teixit cardíac, d'una manera semblant a la que es troba en estats patològics com la sobrecàrrega crònica que té lloc durant l'insuficiència cardíaca o la hipertensió (255;256). La presència de fibrosi cardíaca demostra l'existència de remodelat estructural i a més afavoreix l'aparició i el manteniment d'arítmies (110;111). Alhora, l'aparició d'arítmies facilita el remodelat elèctric. En condicions normals la deposició de col·lagen en el cor és baixa, en canvi, en estats patològics com la hipertròfia, el infart de miocardi i la fallida cardíaca, es dóna un marcat increment en aquesta deposició (206). En el nostre model animal, s'ha detectat fibrosi en el teixit miocardíac mitjancant la l'observació i quantificació de la deposició de col·lagen en talls histològics, la determinació dels nivells d'hidroxiprolina, i per l'anàlisi de l'expressió de marcadors profibròtics i components de la matriu extracel·lular. A més, mitjançant técniques immunohistològiques es va localitzar una presència important de miofibroblasts, essent aquest un tipus cel·lular forca atípic en el teixit cardíac saludable (257). En conjunt aquests resultats demostren que els nostres animals van desenvolupar fibrosi intersticial després de 16 setmanes d'exercici intens. La presència de fibrosi en el teixit cardiac es va observar en paral·lel amb el desenvolupament de la disfunció diastòlica, indicant que aquesta alteració en la capacitat de distensió del teixit es podría atribuïr a la presència de fibrosi. En aquest sentit, diversos estudis realitzats amb models animals d'exercici agut, mostren la formació de teixit de cicatrització en el cor i també l'expressió elevada de marcadors de dany cardíac immediatament després d'una sessió intensa d'exercici (<sup>231;258</sup>). Tant els nostres resultats com els d'aquests estudis relacionen l'exercici amb alteracions en la bioquímica del teixit cardíac.

Els animals que van realitzar 16 setmanes d'exercici intens van mostrar un increment significatiu en la expressió de TGF- $\beta$ 1, tant en el ventricle dret com en les dues

aurícules. El TGF- $\beta$ 1 és un potent estimulador de la producció de col·lagen en els miofibroblasts cardíacs (<sup>38</sup>) i condueix al desenvolupament de fibrosi. Hi ha molts estudis experimentals que relacionen els increments d'aquesta citocina amb la transformació fenotípica dels fibroblasts i el desenvolupament de fibrosi cardíaca (141;158-160;259;260). Al mateix temps, es va observar una major expressió en diversos components de la matriu extracel·lular com la fibronectina-1, els col·làgens, la MMP-2 i el TIMP-1. El col·lagen tipus I determina la rigidesa del múscul cardíac, mentre que el col·lagen tipus III té més capacitat de distensió i en determina l'elasticitat. Per tant, la relació entre el col·lagen tipus I i el col·lagen tipus III determina la rigidesa del teixit cardíac (<sup>261</sup>). Al llarg dels nostres experiments, hem pogut observar gue, després de 16 setmanes d'exercici, es dóna un increment significatiu tant en l'expressió de mRNA com en la síntesi proteica del col·lagen tipus I, en la meitat dreta del cor. En canvi l'expressió i la síntesi de col·lagen tipus III es manté sense canvis. Aquests resultats indiguen que l'exercici crònic incrementa la rigidesa cardíaca en algunes cambres cardíaques per mitjà de l'alteració de l'estructura i composició natural de la matriu extracel·lular, explicant la disfunció diastòlica observada а les ecocardiografies.

El contingut en col·lagen del miocardi depèn de l'equilibri entre la seva síntesi i degradació. El metabolisme del col·lagen extracel·lular, està estrictament regulat per l'activitat coordinada de les MMPs i els TIMPs (<sup>262</sup>), l'expressió dels guals es regulada per citocines i factors de creixement alliberats al medi principalment pels fibroblasts. La MMP-2 és un enzim proteolític que en estat activat indueix la disrupció de les proteïnes de la matriu extracel·lular i promou la fibrogènesi (<sup>263</sup>). L'activitat extracel·lular de la MMP-2 está regulada parcialment per l'inhibidor tissular TIMP-1 (264). És important conèixer la relació entre l'activitat de MMPs i TIMPs durant qualsevol procés fibròtic ja que permet valorar l'estat de la matriu. En els nostres estudis, es va obtenir un increment en l'expressió de mRNA de l'MMP-2, tant a les aurícules com en el ventricle dret del grup sotmès a exercici, a partir de les 8 setmanes, que va esdevenir significatiu a les 16 setmanes. En quant als resultats obtinguts per a l'expressió d'mRNA del TIMP-1, també es van observar petits increments en els grups exercici de 8 setmanes, a les dues aurícules i al ventricle dret. A les 16 setmanes es van continuar observant aquests increments que únicament van ser estadísticament sigificatius en el ventricle dret. A nivell proteic, es va obtenir un increment significatiu en la síntesi de MMP-2 a les dues aurícules en els animals sotmesos a exercici durant 16 setmanes. Per contra, els nivells de proteïna pel TIMP-1 van romandre sense canvis entre els diferents grups i en totes les cambres.

Una possible explicació per aquests resultats, seria la següent: davant de la situació de sobrecàrrega que es produeix durant l'exercici, el teixit miocardíac activa un seguit de mecanismes que inicien els processos adaptatius. En primer lloc, els miòcits responen a la creixent càrrega d'estrès incrementant la seva mida. Al fer-ho es produeix el primer fenomen observat, la hipertròfia. Per tal de crear l'espai necessari, els fibroblasts cardíacs comencen a expressar MMPs que degraden la matriu extracel·lular (<sup>263;265</sup>). Durant aquest procés es poden produir petites lesions. Algunes d'aquestes lesions podrien comportar la mort d'algun miòcit, i per tant, iniciarien un procés de recanvi i pèrdua cel·lular. Tant la mort cel·lular com la degradació de la matriu extracel·lular generen espais buits entre els miòcits. Els fibroblasts reemplacen aquests espais buits, i expressen TGF- $\beta$ 1, un reconegut factor de creixement de fibroblasts i un dels estímuls responsables de la diferenciació d'aquests a miofibroblasts (<sup>266</sup>). El TGF- $\beta$ 1 actua promovent la quimiotaxis i l'activitat sintetitzadora de col·lagen de fibroblasts i miofibroblasts. Els miofibroblasts, generalment apareixen en situacions patològiques com la fibrosi intersticial progressiva, que es pot observar en diferents òrgans com a conseqüència de diversos tipus de danys (267;268). En aquestes situacions, els miofibroblasts proliferen i secreten proteïnes de la matriu extracel·lular, especialment col·lagen tipus I i col·lagen tipus III (<sup>267-271</sup>). Tot plegat promou la desestructuració i l'expansió de la matriu extracel·lular, que finalment, pot acabar causant alteracions en la conducció elèctrica entre els miòcits, forçant l'aparició de vies alternatives i circuits de reentrada.

Els increments observats tant en l'expressió i síntesi de TGF- $\beta$ 1 i MMP-2, com en la deposició de col·lagen induïts per l'exercici apareixen en funció del temps. A més, aquests canvis són específics per cada una de les cambres, ja que el ventricle esquerre aparentment no està afectat. Assumint que l'exercici incrementa les condicions de càrrega del cor en totes les cambres per igual (<sup>252</sup>), sembla raonable pensar que s'obtindrà un major remodelat profibròtic en aquelles cambres que tenen una paret més feble i per tant acusen més la situació de sobrecàrrega. Recolzant aquests raonaments, un estudi clínic ha descrit que durant la pràctica d'exercici de resistència es produeixen unes condicions de càrrega majors en el ventricle dret que en l'esquerre (<sup>272;273</sup>). Aquesta sobrecàrrega en el ventricle dret, podria ser la causa de la disfunció transitòria que s'observa immediatament després d'una practica intensa d'exercici (274). En aquest sentit, sembla ser que els gruixos de paret (més primes en les aurícules i en el ventricle dret) són els responables de que aquestes cambres siguin més susceptibles a patir processos de remodelat (<sup>275</sup>). Seguint amb aquèsta hipòtesi un estudi va descriure una sobre-expressió regional de factors de creixement i deposició de col·làgens en el ventricle dret però no en l'esquerre en un

model animal de sobrecarrega crònica de volum, comparable amb el nostre model d'entrenament de resistència (<sup>276</sup>). Aquesta absència de fibrosi en el ventricle esquerre coincideix amb els resultats obtinguts en altres models d'exercici crònic (<sup>277;278</sup>). A més, el fet que ni nosaltres ni estudis semblants trobin canvis típics de remodelat fibròtic en el ventricle esquerre coincideix amb la descripció clàssica d'hipertrofia fisiològica en el cor d'atleta (<sup>252</sup>).

Actualment es disposa de molta informació respecte els canvis que l'exercici produeix en en la morfología i funcionalitat del cor obtinguda per mètodes no invasius com l'ecocardiografia (<sup>253;279</sup>). En canvi, la disponibilitat de dades referents a l'histologia o a paràmetres bioquímics propis del miocardi provinents d'atletes de resistència, són més escassos. En tot cas, existeixen alguns estudis basats en casos clínics que presenten evidències post-mortem de la presència de fibrosi miocardíaca en atletes de resistència (<sup>18;280;281</sup>). En aquest sentit, recentment s'ha demostrat un augment en l'expressió de marcadors de fibrosi en el plasma d'atletes veterans (<sup>203</sup>). Desafortunadament, aquest estudi no va poder determinar si l'origen d'aquest increment era cardíac o no. Per tant, el nostre estudi representa la primera evidència directa de remodelació cardíaca potencialment adversa com a conseqüència de l'exercici físic de llarga durada. A més, a diferència dels resultats provinents d'estudis clínics, els resultats presentats en aquest treball han estat obtinguts en un ambient controlat i per tant hi ha menys variables que podrien haver-hi influenciat.

Els mecanismes mitjançant els quals l'exercici crònic promou la fibrosi cardíaca no es coneixen. Diversos estudis experimentals suggereixen que els processos de remodelació cardíaca fisiològica i patològica impliquen diferents vies de senyalització (<sup>282;283</sup>). Generalment, els resultats que presenten aquests estudis han estat obtinguts a partir d'experiments realitzats en les primeres fases de l'adaptació. Per tant, no es poden extrapolar a les conseqüències que pot tenir la sobrecàrrega cardíaca secundaria a l'exercici intens a llarg termini. Altres estudis, han demostrat que l'estimulació excessiva dels sistemes fisiològics pot desencadenar respostes maladaptatives (<sup>284;285</sup>). Aquests resultats dónen suport a la nostra hipòtesi segons la qual la suma de petites agressions produïdes per l'exercici intens, a llarg termini, poden acabar produint un remodelat per fibrosi.

En l'actualitat, nombrosos estudis clínics suggereixen que l'exercici d'alt rendiment podria estar associat amb un increment en el risc de patir arítmies (<sup>15;16;250;272;286-290</sup>). Un dels aspectes més importants dels nostres estudis és que el remodelat observat després de l'activitat física facilita l'aparició arítmies, inclús en absència d'un altre

substrat de fons. La fibrosi cardíaca i el desordre en l'estructura i composició del miocardi que se l'hi associa pot proporcionar l'heterogeneïtat elèctrica necessària per promoure els circuits de reentrada i la aritmogènesi ( $^{272}$ ). En aquest sentit, tant la sobrexpressió de TGF- $\beta$ 1, com els increments en els col·làgens i les MMPs han estat relacionats amb un major risc de patir arítmies auriculars ( $^{207;291}$ ) i ventriculars ( $^{292}$ ). Per això, es va avaluar l'inducibilitat d'arítmies mitjançant la realització d'estudis d'electrofisiologia en viu en els grups d'animals de 16 setmanes. En un 42% dels animals que havien estat sotmesos a exercici es va induir una arítmia ventricular sostinguda, en front de només el 6% dels animals de vida sedentària. A més, amb aquests estudis també es va observar un increment en la durada de l'interval QRS en els animals sotmesos a exercici, el que indica que s'està donant una conducció ventricular més lenta. Per tant, és molt possible que la fibrosi observada en els arítmies.

Després de confirmar la hipòtesi inicial de que l'exercici intens i continuat pot provocar el desenvolupament de fibrosi en el teixit cardíac, es va voler provar la capacitat de reversió del remodelat cardíac produït en els nostres animals esportistes. La reversió dels canvis morfològics característics del cor d'atleta ha estat observada en profesionals d'elit un cop han deixat de competir (<sup>293</sup>). Nosaltres hem avaluat si un període de repòs pot revertir els canvis profibròtics induïts per l'entrenament de resistència en el cor dels animals sotmesos a exercici. Després de 16 setmanes d'exercici, es van establir tres temps de repòs (2, 4, i 8 setmanes) per valorar quin era el temps òptim per estudiar l'efecte que té aturar l'exercici en la reversió dels danys. Es van avaluar diferents paràmetres cardíacs per determinar la presència de fibrosi i l'estat del remodelat estructural. Els resultats d'aquesta interrupció de l'exercici, van evidenciar que després de 8 setmanes de repòs, pràcticament tots els paràmetres cardíacs alterats tornaven a la normalitat. La pèrdua de pes provocada per l'exercici es va començar a recuperar després de 4 setmanes de repòs. De la mateixa manera, la proporció entre el pes del cor i el pes corporal, que en tot moment va mostrar diferències significatives entre els grups sotmesos a exercici i els seus respectius grups sedentaris, també va començar a mostrar signes de recuperació després de 2 setmanes de repòs. Aquesta aparent reversió en la hipertròfia cardíaca es va confirmar amb les mesures dels gruixos de les parets cardíaques. Els resultats obtinguts van mostrar una regressió en la hipertròfia del ventricle esquerre a partir de les 4 setmanes de repòs. Per tant, els nostres resultats coincideixen amb les observacions fetes en individus entrenats que descriuen que després d'un temps de repòs la paret del ventricle esquerre presenta un gruix normal (<sup>293</sup>). A partir de les histologies es va poder observar que de tots els grups de l'estudi, el grup d'animals que va córrer 16 setmanes va ser el que va presentar una major deposició de col·lagen. Tant la seva quantificació per morfometria en la tinció de picrosirius com la valoració en els nivells d'hidroxiprolina van confirmar aquesta observació. En aquesta mateixa direcció, els resultats que es van obtenir durant l'avaluació de l'expressió d'mRNA de TGF-β1, MMP-2, fibronectina-1, col·lagen tipus I, i col·lagen tipus III, també van mostrar que el major increment es trobava en el grup d'exercici de 16 setmanes. Els grups de repòs van mostrar un retorn cap a uns nivells d'expressió semblants als nivells d'expressió del grup d'animals sedentaris. A més, la valoració de la presència de miofibroblasts per immunohistoquímica, va mostrar marcatges positius d'α-SMA, únicament en mostres de ventricle dret del grup d'animals sotmesos a exercici i del grup de repòs de 2 setmanes. Aquest resultat indica que la presència de miofibroblasts en el teixit cardíac va anar disminuïnt progressivament a mesura que transcorria el temps de repòs. Per tant, els nostres resultats demostren que un determinat període de repòs és capaç d'aturar i revertir el procés patològic originat per la pràctica d'exercici intens i de llarga durada.

Tot i que el repòs reverteix el procés d'hipertròfia generat per l'exercici i atura l'expressió de factors de creixement i proteïnes que afavoreixen el remodelat, no proporciona una solució definitiva al problema. La fibrosi miocardíaca intersticial progressiva i la fibrosi perivascular contribueixen a un increment en la rigidesa del miocardi i, en conseqüència també al desenvolupament de disfunció diastòlica, a més de ser un substrat potencial per a l'aparició d'arítmies. Per tant, la reversió del remodelat aritmogènic té una gran importància clínica. El repòs pot revertir l'hipertròfia provocada per l'exercici i frenar l'expressió de marcadors profibròtics, però no pot revertir els canvis provocats per l'arítmia. Per tant, els efectes beneficiosos del repòs són limitats i caldría considerar altres mecanismes per revertir els processos de remodelat per fibrosi. En tot cas, el repòs hauría de servir com a mesura preventiva i per ajustar el protocol d'entrenament físic als canvis que s'observen en la morfologia cardíaca, abans de que tinguin lloc fenòmens més greus com el remodelat o l'aparició d'arítmies. Tenint en compte que l'esport de competició està fonamentat en un espiral de superació que sempre va creixent, la intensitat d'entrenament i l'esforc sempre són majors. Aconseguir concienciar a aficionats i profesionals d'esports de resistència que canviïn els hàbits d'entrenament o les modalitats esportives és molt difícil si no existeix un consens absolut en els riscos potencials que aquesta activitat pot comportar per la seva salut.

Davant d'aquestes consideracions cal reconèixer la necessitat de realitzar més estudis que esclareixin els mecanismes que participen en el remodelat per fibrosi provocat per exercici intens i de llarga durada. Altres questions que serien importants abordar, inclourien determinar la relació entre la intensitat de l'exercici i el remodelat, i si el procés de reversió del remodelat requereix un cessament complet de l'activitat o simplement moderar el programa d'entrenament.

Disposar de tractaments per la prevenció de la fibrosi cardíaca és de vital importància per evitar futurs esdeveniments cardiovasculars (<sup>56;204;294;295</sup>). L'angiotensina-II és un estímul molt potent per la progressió del remodelat cardíac i juga un paper important en el desenvolupament de la fibrosi cardíaca (<sup>109;134;296</sup>). Hi ha estudis que afirmen que l'angiotensina-II circulant té un paper central en la progressió de la fibrosi intersticial i la hipertròfia en pacients hipertensos (<sup>297;298</sup>). A més, està descrit que el seu bloqueig mitjançant antagonistes del seu receptor AT1 té efectes antifibròtics (<sup>299;300</sup>). Per això en aquest treball s'ha avaluat l'efecte d'utilitzar un fàrmac antagonista selectiu del receptor AT1 en el desenvolupament de fibrosi provocada per l'exercici.

Diversos estudis han descrit que la hipertròfia ventricular esquerra detectada per ecocardiografia pot ser un predictor independent de la morbiditat i mortalitat en individus amb una pressió sanguínia elevada (<sup>301</sup>) i en la població en general (<sup>302</sup>). En la literatura científica es troben molts estudis que avaluen els beneficis terapèutics dels inhibidors de l'enzim convertidor de l'angiotensina o de la intervenció d'antagonistes del receptor AT1 en la reducció de la hipertrofia del ventricle esquerre (<sup>303;304</sup>). D'acord amb aquests estudis, els nostres resultats mostren que el tractament amb Losartan redueix significativament el desenvolupament d'hipertròfia en el ventricle esquerre del grup d'animals sotmesos a exercici. A més, els resultats obtinguts en quant a l'expressió d'mRNA dels diferents marcadors de fibrosi, mostren que el grup sotmès a exercici i tractat amb Losartan presenten uns valors significativament menors que el grup d'exercici no tractat. Concretment, vam obtenir un increment significatiu en l'expressió de mRNA de TGF- $\beta$ 1, MMP-2, Fibronectina-1, col·lagen tipus I, i col·lagen tipus III com a conseqüència d'una pràctica intensa i continuada de l'exercici físic. El tractament amb Losartan va poder reduir tots aquests increments en l'expressió de mRNA a nivells de control, evidenciant l'efecte beneficiós del bloqueig de la via de la renina-angiotensina en la prevenció del remodelat profibròtic del teixit cardíac secundari a l'exercici. Els efectes antifibròtics del bloqueig del receptor AT1 de l'angiotensina-II han estat també descrits en altres estudis (299;300). Els nostres resultats estàn d'acord amb els obtinguts per Chen i colaboradors, on demostren que els antagonistes del receptor AT1 prevenen la inducció inicial de TGF- $\beta$ 1 i el posterior desenvolupament de fibrosi cardíaca (<sup>305</sup>). Per tant aquests resultats obren la porta a la possibilitat d'utilitzar tractaments farmacològics per la prevenció dels efectes adversos de l'exercici sobre el teixit cardíac.

# CONCLUSIONS

### 6. CONCLUSIONS

El model animal desenvolupat proporciona un instrument útil per investigar els mecanismes fisiopatològics produïts per una practica esportiva intensa.

La practica esportiva intensa indueix el desenvolupament de fibrosi cardíaca. Aquesta progressa al llarg del temps a mida que s'acumulen hores d'exercici i s'observa principalment al ventricle dret.

El desenvolupament de fibrosi cardíaca està precedit per l'establiment d'hipertròfia cardíaca que es comença a observar a les 4 setmanes d'exercici intens.

A les 16 setmanes d'exercici intens ja està establert el procés fibròtic, mediat per un augment en els nivells de TGF- $\beta$ 1, Fibronectina-1 MMP-2, TIMP-1 i col·lagen I i III.

La fibrosi cardíaca contribueix a incrementar la rigidesa del teixit i per tant la disfunció diastòlica. A més, facilita el desenvolupament d'arítmies.

Aturar l'entrenament durant un període de temps és capaç de revertir la hipertrofia i la fibrosi induïda per l'exercici.

El bloqueig del receptor AT1 de l'angiotensina evita el desenvolupament de fibrosi cardíaca induïda per exercici.

# **BIBLIOGRAFIA**

### **BIBLIOGRAFIA**

- 1. Shephard RJ, Balady GJ. Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation*. 1999;99:963-972.
- Booth FW, Chakravarthy MV, Gordon SE et al. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. J Appl Physiol. 2002;93:3-30.
- 3. Chakravarthy MV, Joyner MJ, Booth FW. An obligation for primary care physicians to prescribe physical activity to sedentary patients to reduce the risk of chronic health conditions. *Mayo Clin Proc.* 2002;77:165-173.
- 4. Berlin JA, Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol*. 1990;132:612-628.
- 5. Paffenbarger RS, Jr., Hyde RT. Exercise as protection against heart attack. *N Engl J Med*. 1980;302:1026-1027.
- 6. Morris CK, Froelicher VF. Cardiovascular benefits of physical activity. *Herz*. 1991;16:222-236.
- 7. Morris JN, Everitt MG, Pollard R et al. Exercise and the heart. *Lancet*. 1981;1:267.
- 8. Chandrashekhar Y, Anand IS. Exercise as a coronary protective factor. *Am Heart J*. 1991;122:1723-1739.
- 9. Wenger NK, Froelicher ES, Smith LK et al. Cardiac rehabilitation as secondary prevention. Agency for Health Care Policy and Research and National Heart, Lung, and Blood Institute. *Clin Pract Guidel Quick Ref Guide Clin*. 1995;1-23.
- 10. Clark RS, Ballantyne D. Physical activity and coronary heart disease. *Scott Med J*. 1981;26:15-20.
- 11. Ballantyne FC, Clark RS, Simpson HS et al. The effect of moderate physical exercise on the plasma lipoprotein subfractions of male survivors of myocardial infarction. *Circulation*. 1982;65:913-918.
- 12. Hambrecht R, Wolf A, Gielen S et al. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2000;342:454-460.
- 13. Neilan TG, Januzzi JL, Lee-Lewandrowski E et al. Myocardial injury and ventricular dysfunction related to training levels among nonelite participants in the Boston marathon. *Circulation*. 2006;114:2325-2333.
- 14. La Gerche A, Connelly KA, Mooney DJ et al. Biochemical and functional abnormalities of left and right ventricular function after ultra-endurance exercise. *Heart*. 2008;94:860-866.
- 15. Biffi A, Pelliccia A, Verdile L et al. Long-term clinical significance of frequent and complex ventricular tachyarrhythmias in trained athletes. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:446-452.

- 16. Mont L, Sambola A, Brugada J et al. Long-lasting sport practice and lone atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2002;23:477-482.
- 17. Vogt S, Koenig D, Prettin S et al. Unusual cause of exercise-induced ventricular fibrillation in a well-trained adult endurance athlete: a case report. *J Med Case Reports*. 2008;2:120.
- 18. Whyte G, Sheppard M, George K et al. Post-mortem evidence of idiopathic left ventricular hypertrophy and idiopathic interstitial myocardial fibrosis: is exercise the cause? *Br J Sports Med.* 2008;42:304-305.
- 19. Neilan TG, Yoerger DM, Douglas PS et al. Persistent and reversible cardiac dysfunction among amateur marathon runners. *Eur Heart J*. 2006;27:1079-1084.
- 20. Holt JP. The normal pericardium. Am J Cardiol. 1970;26:455-465.
- 21. Fowler NO. Pericardial disease. *Heart Dis Stroke*. 1992;1:85-94.
- 22. Fast VG, Kleber AG. Microscopic conduction in cultured strands of neonatal rat heart cells measured with voltage-sensitive dyes. *Circ Res.* 1993;73:914-925.
- 23. Geddes LA, Havel W. Evolution of the optimum bidirectional (+/- biphasic) wave for defibrillation. *Biomed Instrum Technol*. 2000;34:39-54.
- 24. Maceira AM, Prasad SK, Khan M et al. Reference right ventricular systolic and diastolic function normalized to age, gender and body surface area from steady-state free precession cardiovascular magnetic resonance. *Eur Heart J*. 2006;27:2879-2888.
- 25. Zak R. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res.* 1974;35:suppl-26.
- 26. Nag AC. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*. 1980;28:41-61.
- 27. Camelliti P, Green CR, Kohl P. Structural and functional coupling of cardiac myocytes and fibroblasts. *Adv Cardiol*. 2006;42:132-149.
- 28. Bing OH, Ngo HQ, Humphries DE et al. Localization of alpha1(I) collagen mRNA in myocardium from the spontaneously hypertensive rat during the transition from compensated hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2335-2344.
- 29. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther*. 2009;123:255-278.
- 30. Pelouch V, Dixon IM, Golfman L et al. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem*. 1993;129:101-120.
- 31. Ju H, Dixon IM. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol*. 1996;12:1259-1267.
- 32. Spinale FG, Zellner JL, Johnson WS et al. Cellular and extracellular remodeling with the development and recovery from tachycardia-induced

cardiomyopathy: changes in fibrillar collagen, myocyte adhesion capacity and proteoglycans. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1591-1608.

- 33. Weber KT. Stroma and the search for common ground. Plumbism or promiscuity? *Cardiovasc Res.* 1995;29:330-335.
- Reed RK, Rubin K, Wiig H et al. Blockade of beta 1-integrins in skin causes edema through lowering of interstitial fluid pressure. *Circ Res.* 1992;71:978-983.
- 35. Noseda M, Schneider MD. Fibroblasts inform the heart: control of cardiomyocyte cycling and size by age-dependent paracrine signals. *Dev Cell*. 2009;16:161-162.
- 36. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2005;65:40-51.
- 37. Pedrotty DM, Klinger RY, Kirkton RD et al. Cardiac fibroblast paracrine factors alter impulse conduction and ion channel expression of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2009;83:688-697.
- Butt RP, Laurent GJ, Bishop JE. Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors. *Eur J Cell Biol.* 1995;68:330-335.
- 39. Manso AM, Kang SM, Ross RS. Integrins, focal adhesions, and cardiac fibroblasts. *J Investig Med*. 2009;57:856-860.
- 40. Kohl P, Camelliti P, Burton FL et al. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *J Electrocardiol*. 2005;38:45-50.
- 41. Salamon A, Toldy E. [Role of fibroblasts in physiologic, reparative and pathologic processes]. *Orv Hetil*. 2007;148:1683-1690.
- 42. Kohl P, Camelliti P, Burton FL et al. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *J Electrocardiol*. 2005;38:45-50.
- 43. Banerjee I, Yekkala K, Borg TK et al. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1080:76-84.
- 44. van den Borne SW, Diez J, Blankesteijn WM et al. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7:30-37.
- 45. Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K et al. Antifibrotic effect of adrenomedullin on coronary adventitia in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2005;65:921-929.
- 46. Goldsmith EC, Hoffman A, Morales MO et al. Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn*. 2004;230:787-794.
- 47. Kohl P. Cardiac cellular heterogeneity and remodelling. *Cardiovasc Res.* 2004;64:195-197.
- 48. Morales MO, Price RL, Goldsmith EC. Expression of Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2) in the developing heart. *Microsc Microanal*. 2005;11:260-267.

- 49. Gao Z, Xu H, DiSilvestre D et al. Transcriptomic profiling of the canine tachycardia-induced heart failure model: global comparison to human and murine heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40:76-86.
- 50. Kaab S, Barth AS, Margerie D et al. Global gene expression in human myocardium-oligonucleotide microarray analysis of regional diversity and transcriptional regulation in heart failure. *J Mol Med*. 2004;82:308-316.
- 51. Burstein B, Libby E, Calderone A et al. Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences. *Circulation*. 2008;117:1630-1641.
- 52. Franco D, Lamers WH, Moorman AF. Patterns of expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model. *Cardiovasc Res.* 1998;38:25-53.
- 53. Barth AS, Merk S, Arnoldi E et al. Functional profiling of human atrial and ventricular gene expression. *Pflugers Arch*. 2005;450:201-208.
- 54. Tabibiazar R, Wagner RA, Liao A et al. Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns. *Circ Res.* 2003;93:1193-1201.
- 55. Ellinghaus P, Scheubel RJ, Dobrev D et al. Comparing the global mRNA expression profile of human atrial and ventricular myocardium with high-density oligonucleotide arrays. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;129:1383-1390.
- 56. Holmes JW, Borg TK, Covell JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng.* 2005;7:223-253.
- 57. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res.* 2000;46:250-256.
- 58. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009;276:161-214.
- 59. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994;1:71-81.
- 60. Quan TE, Cowper S, Wu SP et al. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:598-606.
- 61. Bouissou H, Pieraggi MT, Thiers JC. [Fibrocytes and activated fibrocytes in the healing of an open skin wound]. *J Soc Biol*. 1999;193:41-48.
- 62. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2006;45:429-438.
- 63. Andersson-Sjoland A, de Alba CG, Nihlberg K et al. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:2129-2140.
- 64. Abu El-Asrar AM, Struyf S, Van Damme J et al. Circulating fibrocytes contribute to the myofibroblast population in proliferative vitreoretinopathy epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol.* 2008;92:699-704.

- 65. Pina IL, Apstein CS, Balady GJ et al. Exercise and heart failure: A statement from the American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention. *Circulation*. 2003;107:1210-1225.
- 66. Thompson PD, Buchner D, Pina IL et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation*. 2003;107:3109-3116.
- 67. Hu FB, Sigal RJ, Rich-Edwards JW et al. Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study. *JAMA*. 1999;282:1433-1439.
- Marcus BH, Albrecht AE, King TK et al. The efficacy of exercise as an aid for smoking cessation in women: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med*. 1999;159:1229-1234.
- 69. Callaghan P. Exercise: a neglected intervention in mental health care? *J Psychiatr Ment Health Nurs*. 2004;11:476-483.
- 70. Penninx BW, Messier SP, Rejeski WJ et al. Physical exercise and the prevention of disability in activities of daily living in older persons with osteoarthritis. *Arch Intern Med.* 2001;161:2309-2316.
- 71. McTiernan A, Kooperberg C, White E et al. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *JAMA*. 2003;290:1331-1336.
- 72. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC et al. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA*. 2001;286:921-929.
- 73. Fletcher GF, Balady G, Blair SN et al. Statement on exercise: benefits and recommendations for physical activity programs for all Americans. A statement for health professionals by the Committee on Exercise and Cardiac Rehabilitation of the Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation*. 1996;94:857-862.
- 74. Braden DS, Strong WB. Cardiovascular responses to exercise in childhood. *Am J Dis Child*. 1990;144:1255-1260.
- 75. Virmani R, Robinowitz M. Cardiac pathology and sports medicine. *Hum Pathol.* 1987;18:493-501.
- 76. Virmani R, Robinowitz M, McAllister HA, Jr. Exercise and the heart. A review of cardiac pathology associated with physical activity. *Pathol Annu*. 1985;20 Pt 2:431-462.
- 77. Scheuer J, Tipton CM. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol*. 1977;39:221-251.
- 78. Pate RR, Branch JD. Training for endurance sport. *Med Sci Sports Exerc*. 1992;24:S340-S343.
- 79. Zeppilli P, Merlino B, Vannicelli R et al. Coronary arteries and athlete's heart. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1989;82 Spec No 2:89-92.

- 80. Sharma S, Maron BJ, Whyte G et al. Physiologic limits of left ventricular hypertrophy in elite junior athletes: relevance to differential diagnosis of athlete's heart and hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:1431-1436.
- 81. Caselli L, Galanti G, Padeletti L et al. Diagnostic accuracy of extended-length electrocardiogram in differentiating between athlete's heart and hypertrophic cardiomyopathy. *J Electrocardiol*. 2009;42:636-641.
- 82. Rich BS, Havens SA. The athletic heart syndrome. *Curr Sports Med Rep.* 2004;3:84-88.
- 83. Seals DR, Hagberg JM, Spina RJ et al. Enhanced left ventricular performance in endurance trained older men. *Circulation*. 1994;89:198-205.
- Whyte G, Lumley S, George K et al. Physiological profile and predictors of cycling performance in ultra-endurance triathletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 2000;40:103-109.
- 85. Banhegyi A, Pavlik G, Olexo Z. The effect of detraining on echocardiographic parameters due to injury. *Acta Physiol Hung.* 1999;86:223-227.
- 86. Siegel AJ, Silverman LM, Evans WJ. Elevated skeletal muscle creatine kinase MB isoenzyme levels in marathon runners. *JAMA*. 1983;250:2835-2837.
- 87. Ohba H, Takada H, Musha H et al. Effects of prolonged strenuous exercise on plasma levels of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in healthy men. *Am Heart J*. 2001;141:751-758.
- 88. Vidotto C, Tschan H, Atamaniuk J et al. Responses of N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and cardiac troponin I (cTnI) to competitive endurance exercise in recreational athletes. *Int J Sports Med.* 2005;26:645-650.
- 89. Scharhag J, Urhausen A, Schneider G et al. Reproducibility and clinical significance of exercise-induced increases in cardiac troponins and N-terminal pro brain natriuretic peptide in endurance athletes. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2006;13:388-397.
- 90. Palazzuoli A, Gallotta M, Quatrini I et al. Natriuretic peptides (BNP and NTproBNP): measurement and relevance in heart failure. *Vasc Health Risk Manag.* 2010;6:411-418.
- 91. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007;28:2525-2538.
- 92. Thygesen K, Alpert JS, White HD et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2007;116:2634-2653.
- 93. Holbrook TC, Birks EK, Sleeper MM et al. Endurance exercise is associated with increased plasma cardiac troponin I in horses. *Equine Vet J Suppl.* 2006;27-31.
- 94. Koller A. Exercise-induced increases in cardiac troponins and prothrombotic markers. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35:444-448.

- 95. McKenzie EC, Jose-Cunilleras E, Hinchcliff KW et al. Serum chemistry alterations in Alaskan sled dogs during five successive days of prolonged endurance exercise. *J Am Vet Med Assoc*. 2007;230:1486-1492.
- 96. Nie J, Tong TK, Shi Q et al. Serum cardiac troponin response in adolescents playing basketball. *Int J Sports Med.* 2008;29:449-452.
- 97. Shave R, George K, Gaze D. The influence of exercise upon cardiac biomarkers: a practical guide for clinicians and scientists. *Curr Med Chem*. 2007;14:1427-1436.
- 98. Tulloh L, Robinson D, Patel A et al. Raised troponin T and echocardiographic abnormalities after prolonged strenuous exercise--the Australian Ironman Triathlon. *Br J Sports Med.* 2006;40:605-609.
- 99. Siegel AJ, Lewandrowski EL, Chun KY et al. Changes in cardiac markers including B-natriuretic peptide in runners after the Boston marathon. *Am J Cardiol*. 2001;88:920-923.
- 100. Thompson PD, Apple FS, Wu A. Marathoner's heart? *Circulation*. 2006;114:2306-2308.
- 101. Herrmann M, Scharhag J, Miclea M et al. Post-race kinetics of cardiac troponin T and I and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in marathon runners. *Clin Chem.* 2003;49:831-834.
- Konig D, Schumacher YO, Heinrich L et al. Myocardial stress after competitive exercise in professional road cyclists. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35:1679-1683.
- 103. Scharhag J, Herrmann M, Urhausen A et al. Independent elevations of Nterminal pro-brain natriuretic peptide and cardiac troponins in endurance athletes after prolonged strenuous exercise. *Am Heart J*. 2005;150:1128-1134.
- 104. Middleton N, Shave R, George K et al. Novel application of flow propagation velocity and ischaemia-modified albumin in analysis of postexercise cardiac function in man. *Exp Physiol.* 2006;91:511-519.
- 105. Neumayr G, Pfister R, Mitterbauer G et al. Effect of competitive marathon cycling on plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and cardiac troponin T in healthy recreational cyclists. *Am J Cardiol*. 2005;96:732-735.
- 106. Tian Y, Nie J, Tong TK et al. Changes in serum cardiac troponins following a 21-km run in junior male runners. *J Sports Med Phys Fitness*. 2006;46:481-488.
- 107. Braunwald E. Regulation of the circulation. I. *N Engl J Med*. 1974;290:1124-1129.
- 108. Blomqvist CG, Saltin B. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol*. 1983;45:169-189.
- 109. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83:1849-1865.

- 110. Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2002;54:230-246.
- 111. Li D, Fareh S, Leung TK et al. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation*. 1999;100:87-95.
- 112. Mazzini MJ, Monahan KM. Pharmacotherapy for atrial arrhythmias: present and future. *Heart Rhythm*. 2008;5:S26-S31.
- 113. Sun Y, Weber KT. Cells expressing angiotensin II receptors in fibrous tissue of rat heart. *Cardiovasc Res.* 1996;31:518-525.
- 114. Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17:174-180.
- 115. Zhao W, Zhao T, Chen Y et al. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*. 2008;317:43-50.
- 116. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y et al. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453:314-321.
- 117. Deschamps AM, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res.* 2006;69:666-676.
- 118. Tao ZY, Cavasin MA, Yang F et al. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci.* 2004;74:1561-1572.
- 119. Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res.* 1999;85:643-650.
- 120. Dahlof B, Herlitz H, Aurell M et al. Reversal of cardiovascular structural changes when treating essential hypertension. The importance of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Hypertens*. 1992;5:900-911.
- 121. Julius S. Blood pressure lowering only or more? Has the jury reached its verdict? *Am J Cardiol*. 2007;100:32J-37J.
- 122. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79:215-262.
- 123. Goette A, Staack T, Rocken C et al. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:1669-1677.
- 124. D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension*. 2005;46:1347-1354.
- 125. Sun Y, Weber KT. Cardiac remodelling by fibrous tissue: role of local factors and circulating hormones. *Ann Med*. 1998;30 Suppl 1:3-8.

- 126. Bernstein ML, Chung KC. Hand fractures and their management: an international view. *Injury*. 2006;37:1043-1048.
- 127. Fleming I, Kohlstedt K, Busse R. The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15:8-13.
- 128. Samuel CS, Unemori EN, Mookerjee I et al. Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo. *Endocrinology*. 2004;145:4125-4133.
- 129. Thibault G, Lacombe MJ, Schnapp LM et al. Upregulation of alpha(8)beta(1)integrin in cardiac fibroblast by angiotensin II and transforming growth factorbeta1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281:C1457-C1467.
- 130. Olson ER, Naugle JE, Zhang X et al. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1131-H1138.
- 131. Klett CP, Palmer AA, Dirig DM et al. Evidence for differences in cultured left ventricular fibroblast populations isolated from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens*. 1995;13:1421-1431.
- 132. Crabos M, Roth M, Hahn AW et al. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *J Clin Invest*. 1994;93:2372-2378.
- 133. Staufenberger S, Jacobs M, Brandstatter K et al. Angiotensin II type 1 receptor regulation and differential trophic effects on rat cardiac myofibroblasts after acute myocardial infarction. *J Cell Physiol*. 2001;187:326-335.
- 134. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2001;2:117-122.
- 135. Hafizi S, Wharton J, Morgan K et al. Expression of functional angiotensinconverting enzyme and AT1 receptors in cultured human cardiac fibroblasts. *Circulation*. 1998;98:2553-2559.
- 136. Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:1947-1958.
- 137. Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2004;63:423-432.
- 138. Sato H, Watanabe A, Tanaka T et al. Regulation of the human tumor necrosis factor-alpha promoter by angiotensin II and lipopolysaccharide in cardiac fibroblasts: different cis-acting promoter sequences and transcriptional factors. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:1197-1205.
- 139. Yokoyama T, Sekiguchi K, Tanaka T et al. Angiotensin II and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol*. 1999;276:H1968-H1976.

- 140. Sano M, Fukuda K, Sato T et al. ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res.* 2001;89:661-669.
- 141. Gray MO, Long CS, Kalinyak JE et al. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1998;40:352-363.
- 142. Chao HH, Chen JJ, Chen CH et al. Inhibition of angiotensin II induced endothelin-1 gene expression by 17-beta-oestradiol in rat cardiac fibroblasts. *Heart*. 2005;91:664-669.
- 143. Wang S, Wang X, Yan J et al. Resveratrol inhibits proliferation of cultured rat cardiac fibroblasts: correlated with NO-cGMP signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2007;567:26-35.
- 144. Calderone A, Bel-Hadj S, Drapeau J et al. Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J Cell Physiol*. 2006;207:165-173.
- 145. Makino N, Sugano M, Satoh S et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands attenuate brain natriuretic peptide production and affect remodeling in cardiac fibroblasts in reoxygenation after hypoxia. *Cell Biochem Biophys.* 2006;44:65-71.
- 146. Chintalgattu V, Nair DM, Katwa LC. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors FIt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:277-286.
- 147. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641.
- 148. da Cunha A, Vitkovic L. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression and regulation in rat cortical astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1992;36:157-169.
- 149. Steigerwalt RW, Rundhaug JE, Nettesheim P. Transformed rat tracheal epithelial cells exhibit alterations in transforming growth factor-beta secretion and responsiveness. *Mol Carcinog.* 1992;5:32-40.
- 150. Lyons RM, Moses HL. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem*. 1990;187:467-473.
- 151. Schabort EJ, van der MM, Loos B et al. TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner. *Exp Cell Res.* 2009;315:373-384.
- 152. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007;74:184-195.
- 153. Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP et al. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res.* 1991;69:483-490.
- 154. Heimer R, Bashey RI, Kyle J et al. TGF-beta modulates the synthesis of proteoglycans by myocardial fibroblasts in culture. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:2191-2198.
- 155. Villarreal FJ, Lee AA, Dillmann WH et al. Adenovirus-mediated overexpression of human transforming growth factor-beta 1 in rat cardiac fibroblasts, myocytes and smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:735-742.
- 156. Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res.* 2007;74:207-212.
- 157. Villarreal FJ, Dillmann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol*. 1992;262:H1861-H1866.
- 158. Tomita H, Egashira K, Ohara Y et al. Early induction of transforming growth factor-beta via angiotensin II type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension*. 1998;32:273-279.
- 159. Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O et al. Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circ Res*. 2000;86:571-579.
- 160. Rosenkranz S, Flesch M, Amann K et al. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGFbeta(1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1253-H1262.
- 161. Hering S, Jost C, Schulz H et al. Circulating transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) is elevated by extensive exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2002;86:406-410.
- 162. Calderone A, Murphy RJ, Lavoie J et al. TGF-beta(1) and prepro-ANP mRNAs are differentially regulated in exercise-induced cardiac hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2001;91:771-776.
- 163. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*. 1982;95:369-377.
- 164. Ruoslahti E, Hayman EG, Pierschbacher M et al. Fibronectin: purification, immunochemical properties, and biological activities. *Methods Enzymol.* 1982;82 Pt A:803-831.
- 165. Mosher DF, Fogerty FJ, Chernousov MA et al. Assembly of fibronectin into extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;614:167-180.
- 166. Mosher DF. Physiology of fibronectin. Annu Rev Med. 1984;35:561-575.
- 167. Grundmeier M, Hussain M, Becker P et al. Truncation of fibronectin-binding proteins in Staphylococcus aureus strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect Immun.* 2004;72:7155-7163.
- 168. Tanaka M, Abe T, Hara Y. Roles of focal adhesions and fibronectin-mediated cohesion in proliferation of confluent fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2009;219:194-201.
- 169. Truter SL, Catanzaro DF, Supino PG et al. Fibronectin gene expression in aortic regurgitation: relative roles of mitogen-activated protein kinases. *Cardiology*. 2009;113:291-298.

- 170. van Dijk A, Niessen HW, Ursem W et al. Accumulation of fibronectin in the heart after myocardial infarction: a putative stimulator of adhesion and proliferation of adipose-derived stem cells. *Cell Tissue Res.* 2008;332:289-298.
- 171. Corda S, Samuel JL, Rappaport L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev.* 2000;5:119-130.
- 172. Peters JH, Ginsberg MH, Bohl BP et al. Intravascular release of intact cellular fibronectin during oxidant-induced injury of the in vitro perfused rabbit lung. *J Clin Invest.* 1986;78:1596-1603.
- 173. Vincent PA, Del Vecchio PJ, Saba TM. Release of fibronectin fragments from endothelial cell monolayers exposed to activated leukocytes: relationship to plasma fibronectin levels after particle infusion. *Exp Mol Pathol*. 1988;48:403-418.
- 174. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827-839.
- 175. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:346-359.
- 176. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274:21491-21494.
- 177. Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S et al. Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest*. 2003;33:648-656.
- 178. Baudino TA, Carver W, Giles W et al. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H1015-H1026.
- 179. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res.* 2000;46:214-224.
- 180. Chen K, Li D, Zhang X et al. Anoxia-reoxygenation stimulates collagen type-I and MMP-1 expression in cardiac fibroblasts: modulation by the PPAR-gamma ligand pioglitazone. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:682-687.
- 181. Goruppi S, Patten RD, Force T et al. Helix-loop-helix protein p8, a transcriptional regulator required for cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast matrix metalloprotease induction. *Mol Cell Biol*. 2007;27:993-1006.
- 182. Wu M, Massaeli H, Durston M et al. Differential expression and activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the calreticulin deficient cells. *Matrix Biol*. 2007;26:463-472.
- 183. Lindsey ML, Goshorn DK, Squires CE et al. Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function. *Cardiovasc Res.* 2005;66:410-419.

- 184. Schram K, Wong MM, Palanivel R et al. Increased expression and cell surface localization of MT1-MMP plays a role in stimulation of MMP-2 activity by leptin in neonatal rat cardiac myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44:874-881.
- 185. Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V et al. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.* 2001;503:158-162.
- 186. McKaig BC, McWilliams D, Watson SA et al. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol.* 2003;162:1355-1360.
- 187. Brown RD, Jones GM, Laird RE et al. Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362:200-205.
- 188. Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK et al. Brain natriuretic Peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res.* 2002;91:1127-1134.
- 189. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C53-C60.
- 190. Husse B, Briest W, Homagk L et al. Cyclical mechanical stretch modulates expression of collagen I and collagen III by PKC and tyrosine kinase in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R1898-R1907.
- 191. Urso ML, Pierce JR, Alemany JA et al. Effects of exercise training on the matrix metalloprotease response to acute exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2009;106:655-663.
- 192. Vianello A, Caponi L, Franzoni F et al. Role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as potential biomarkers of left ventricular remodelling in the athlete's heart. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117:157-164.
- 193. Willenbrock F, Murphy G. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:S165-S170.
- 194. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*. 1997;74:111-122.
- 195. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477:267-283.
- 196. Baker AH, Zaltsman AB, George SJ et al. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest*. 1998;101:1478-1487.
- 197. Tyagi SC, Kumar SG, Banks J et al. Co-expression of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase in myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:2177-2189.

- 198. Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK et al. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem*. 1996;155:13-21.
- 199. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation*. 2000;102:1944-1949.
- 200. Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ et al. Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. *Eur Heart J*. 2004;25:1509-1516.
- 201. Tyagi SC, Kumar S, Glover G. Induction of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase by serum in human heart-derived fibroblast and endomyocardial endothelial cells. *J Cell Biochem*. 1995;58:360-371.
- 202. Barton PJ, Birks EJ, Felkin LE et al. Increased expression of extracellular matrix regulators TIMP1 and MMP1 in deteriorating heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2003;22:738-744.
- 203. Lindsay MM, Dunn FG. Biochemical evidence of myocardial fibrosis in veteran endurance athletes. *Br J Sports Med*. 2007;41:447-452.
- 204. Pellman J, Lyon RC, Sheikh F. Extracellular matrix remodeling in atrial fibrosis: mechanisms and implications in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:461-467.
- 205. Polyakova V, Miyagawa S, Szalay Z et al. Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation. *J Cell Mol Med*. 2008;12:189-208.
- 206. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*. 1989;13:1637-1652.
- 207. Xu J, Cui G, Esmailian F et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation*. 2004;109:363-368.
- 208. Pauschinger M, Doerner A, Remppis A et al. Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation. *Cardiovasc Res.* 1998;37:123-129.
- 209. Takala TE, Ramo P, Kiviluoma K et al. Effects of training and anabolic steroids on collagen synthesis in dog heart. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1991;62:1-6.
- 210. Lu L, Chen SS, Hassid A et al. Cardiac fibrogenesis following infarction in mice with deletion of inducible nitric oxide synthase. *Am J Med Sci.* 2008;335:431-438.
- 211. Tan ZY, Lu Y, Whiteis CA et al. Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR. *Circ Res.* 2010;106:536-545.
- 212. Plante E, Lachance D, Beaudoin J et al. Comparative study of vasodilators in an animal model of chronic volume overload caused by severe aortic regurgitation. *Circ Heart Fail*. 2009;2:25-32.

- 213. Lau DH, Clausen C, Sosunov EA et al. Epicardial border zone overexpression of skeletal muscle sodium channel SkM1 normalizes activation, preserves conduction, and suppresses ventricular arrhythmia: an in silico, in vivo, in vitro study. *Circulation*. 2009;119:19-27.
- 214. Shiroshita-Takeshita A, Sakabe M, Haugan K et al. Model-dependent effects of the gap junction conduction-enhancing antiarrhythmic peptide rotigaptide (ZP123) on experimental atrial fibrillation in dogs. *Circulation*. 2007;115:310-318.
- 215. Lambert V, Capderou A, Le Bret E et al. Right ventricular failure secondary to chronic overload in congenital heart disease: an experimental model for therapeutic innovation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139:1197-204, 1204.
- 216. Niemann JT, Youngquist S, Rosborough JP et al. Infliximab attenuates early myocardial dysfunction after resuscitation in a swine cardiac arrest model. *Crit Care Med*. 2010;38:1162-1167.
- 217. Sukumaran V, Watanabe K, Veeraveedu PT et al. Telmisartan, an angiotensin-II receptor blocker ameliorates cardiac remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Hypertens Res.* 2010.
- 218. Boulaksil M, Winckels SK, Engelen MA et al. Heterogeneous Connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias. *Eur J Heart Fail*. 2010.
- 219. de Waard MC, Duncker DJ. Prior exercise improves survival, infarct healing, and left ventricular function after myocardial infarction. *J Appl Physiol*. 2009;107:928-936.
- 220. Wan W, Powers AS, Li J et al. Effect of post-myocardial infarction exercise training on the renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac function. *Am J Med Sci.* 2007;334:265-273.
- 221. Chicco AJ, McCune SA, Emter CA et al. Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension*. 2008;51:1096-1102.
- 222. Lachance D, Plante E, Bouchard-Thomassin AA et al. Moderate exercise training improves survival and ventricular remodeling in an animal model of left ventricular volume overload. *Circ Heart Fail*. 2009;2:437-445.
- 223. Sun MW, Qian FL, Wang J et al. Low-intensity voluntary running lowers blood pressure with simultaneous improvement in endothelium-dependent vasodilatation and insulin sensitivity in aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2008;31:543-552.
- 224. Pellegrin M, Alonso F, Aubert JF et al. Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension*. 2009;53:782-789.
- 225. Filaire E, Rouveix M, Massart A et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in rat: effect of food restriction and wheel running. *Eur J Appl Physiol*. 2009;107:243-250.

- 226. Kolwicz SC, MacDonnell SM, Kendrick ZV et al. Voluntary wheel running and pacing-induced dysfunction in hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2008;30:565-573.
- 227. Baptista S, Piloto N, Reis F et al. Treadmill running and swimming imposes distinct cardiovascular physiological adaptations in the rat: focus on serotonergic and sympathetic nervous systems modulation. *Acta Physiol Hung*. 2008;95:365-381.
- 228. Zhang QJ, Li QX, Zhang HF et al. Swim training sensitizes myocardial response to insulin: role of Akt-dependent eNOS activation. *Cardiovasc Res.* 2007;75:369-380.
- 229. Barauna VG, Batista ML, Jr., Costa Rosa LF et al. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32:249-254.
- 230. Uchiyama S, Tsukamoto H, Yoshimura S et al. Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. *Pflugers Arch*. 2006;452:109-116.
- 231. Chen Y, Serfass RC, Mackey-Bojack SM et al. Cardiac troponin T alterations in myocardium and serum of rats after stressful, prolonged intense exercise. *J Appl Physiol*. 2000;88:1749-1755.
- 232. Fenning A, Harrison G, Dwyer D et al. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. *Mol Cell Biochem*. 2003;251:51-59.
- 233. Kodesh E, Horowitz M. Soleus adaptation to combined exercise and heat acclimation: physiogenomic aspects. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42:943-952.
- 234. FULTON RM, HUTCHINSON EC, JONES AM. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J*. 1952;14:413-420.
- 235. Batista EC, Batista EC, Ramalho JD et al. Swimming training exacerbates pathological cardiac hypertrophy in kinin B2 receptor-deficient mice. *Int Immunopharmacol.* 2008;8:271-275.
- 236. Rocha FL, Carmo EC, Roque FR et al. Anabolic steroids induce cardiac reninangiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H3575-H3583.
- 237. Roussel E, Gaudreau M, Plante E et al. Early responses of the left ventricle to pressure overload in Wistar rats. *Life Sci*. 2008;82:265-272.
- 238. Reffelmann T, Kloner RA. Transthoracic echocardiography in rats. Evalution of commonly used indices of left ventricular dimensions, contractile performance, and hypertrophy in a genetic model of hypertrophic heart failure (SHHF-Mcc-facp-Rats) in comparison with Wistar rats during aging. *Basic Res Cardiol*. 2003;98:275-284.
- 239. Luna LG. Histopathological Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts, 1st edition, American Histolabs, Inc., Gaithersburg, MD, 1992. 1992.
- Ref Type: Generic

240. Luna LG. Manual of Histologic Staining Methods of the AFIP, 3rd edition. McGraw-Hill Book Company, New York, New York, 1968. 1968.

Ref Type: Generic

- 241. Bancroft JD SA. Theory and Practice of Histological Techniques, 4th edition, Churchill Livingstone Inc., New York, New York, 1996. 1996.
- Ref Type: Generic
- 242. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11:447-455.
- 243. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol*. 1973;150:174-187.
- 244. Chaponnier C, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol.* 2004;204:386-395.
- 245. Nemethy G, Scheraga HA. Stabilization of collagen fibrils by hydroxyproline. *Biochemistry*. 1986;25:3184-3188.
- 246. Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961;93:440-447.
- 247. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.
- 248. Corrado D, Thiene G, Nava A et al. Sudden death in young competitive athletes: clinicopathologic correlations in 22 cases. *Am J Med.* 1990;89:588-596.
- 249. Black SA. Triathlon participation for the physically challenged athlete: medical considerations. *Curr Sports Med Rep.* 2007;6:195-199.
- 250. Ector J, Ganame J, van der MN et al. Reduced right ventricular ejection fraction in endurance athletes presenting with ventricular arrhythmias: a quantitative angiographic assessment. *Eur Heart J*. 2007;28:345-353.
- 251. Ballantyne FC, Clark RS, Simpson HS et al. The effect of moderate physical exercise on the plasma lipoprotein subfractions of male survivors of myocardial infarction. *Circulation*. 1982;65:913-918.
- 252. Fagard R. Athlete's heart. Heart. 2003;89:1455-1461.
- 253. Maron BJ, Pelliccia A. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation*. 2006;114:1633-1644.
- 254. Sipola P, Heikkinen J, Laaksonen DE et al. Influence of 12 weeks of jogging on magnetic resonance-determined left ventricular characteristics in previously sedentary subjects free of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2009;103:567-571.
- 255. Hanna N, Cardin S, Leung TK et al. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res.* 2004;63:236-244.

- 256. Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A et al. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation*. 2004;110:1263-1268.
- 257. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J et al. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med*. 2000;135:316-323.
- 258. Verzola RM, Mesquita RA, Peviani S et al. Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39:621-627.
- 259. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*. 2002;39:258-263.
- 260. Brooks WW, Conrad CH. Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:187-195.
- 261. Norton GR, Tsotetsi J, Trifunovic B et al. Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 1997;96:1991-1998.
- 262. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991;5:2145-2154.
- 263. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87:1285-1342.
- 264. Soini Y, Satta J, Maatta M et al. Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J Pathol*. 2001;194:225-231.
- 265. Truter SL, Catanzaro DF, Supino PG et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors and extracellular matrix remodeling in aortic regurgitant hearts. *Cardiology*. 2009;113:161-168.
- 266. Tiggelman AM, Linthorst C, Boers W et al. Transforming growth factor-betainduced collagen synthesis by human liver myofibroblasts is inhibited by alpha2-macroglobulin. *J Hepatol*. 1997;26:1220-1228.
- 267. Grimaud JA, Borojevic R. Myofibroblasts in hepatic schistosomal fibrosis. *Experientia*. 1977;33:890-892.
- 268. Zhang G, Moorhead PJ, el Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Exp Nephrol*. 1995;3:308-318.
- 269. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest*. 1990;63:21-29.
- 270. Desmouliere A, Gabbiani G. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during pathological situations: the role of extracellular matrix and cytokines. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1994;29:195-203.
- 271. Sun Y, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:851-858.

- 272. Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:802-809.
- 273. Douglas PS, O'Toole ML, Hiller WD et al. Different effects of prolonged exercise on the right and left ventricles. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:64-69.
- 274. Davila-Roman VG, Guest TM, Tuteur PG et al. Transient right but not left ventricular dysfunction after strenuous exercise at high altitude. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:468-473.
- 275. Ector J, Ganame J, van der MN et al. Reduced right ventricular ejection fraction in endurance athletes presenting with ventricular arrhythmias: a quantitative angiographic assessment. *Eur Heart J*. 2007;28:345-353.
- 276. Modesti PA, Vanni S, Bertolozzi I et al. Different growth factor activation in the right and left ventricles in experimental volume overload. *Hypertension*. 2004;43:101-108.
- 277. Rocha FL, Carmo EC, Roque FR et al. Anabolic steroids induce cardiac reninangiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H3575-H3583.
- 278. Woodiwiss AJ, Oosthuyse T, Norton GR. Reduced cardiac stiffness following exercise is associated with preserved myocardial collagen characteristics in the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1998;78:148-154.
- 279. Pelliccia A, Maron BJ, Di Paolo FM et al. Prevalence and clinical significance of left atrial remodeling in competitive athletes. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:690-696.
- 280. Suarez-Mier MP, Aguilera B. [Causes of sudden death during sports activities in Spain]. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55:347-358.
- 281. Lesauskaite V, Valanciute A. Causes of sudden cardiac death in young athletes: the role of hypoperfusion. *Am J Forensic Med Pathol*. 1998;19:157-161.
- 282. Selvetella G, Hirsch E, Notte A et al. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc Res.* 2004;63:373-380.
- 283. Kong SW, Bodyak N, Yue P et al. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics*. 2005;21:34-42.
- 284. O'Neill BT, Abel ED. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J Clin Invest.* 2005;115:2059-2064.
- 285. Shiojima I, Sato K, Izumiya Y et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*. 2005;115:2108-2118.
- 286. Elosua R, Arquer A, Mont L et al. Sport practice and the risk of lone atrial fibrillation: a case-control study. *Int J Cardiol.* 2006;108:332-337.
- 287. Heidbuchel H, Anne W, Willems R et al. Endurance sports is a risk factor for atrial fibrillation after ablation for atrial flutter. *Int J Cardiol*. 2006;107:67-72.

- 288. Baldesberger S, Bauersfeld U, Candinas R et al. Sinus node disease and arrhythmias in the long-term follow-up of former professional cyclists. *Eur Heart J*. 2008;29:71-78.
- 289. Aizer A, Gaziano JM, Cook NR et al. Relation of vigorous exercise to risk of atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2009;103:1572-1577.
- 290. Heidbuchel H, Hoogsteen J, Fagard R et al. High prevalence of right ventricular involvement in endurance athletes with ventricular arrhythmias. Role of an electrophysiologic study in risk stratification. *Eur Heart J*. 2003;24:1473-1480.
- 291. Mukherjee R, Herron AR, Lowry AS et al. Selective induction of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in atrial and ventricular myocardium in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* 2006;97:532-537.
- 292. Blangy H, Sadoul N, Dousset B et al. Serum BNP, hs-C-reactive protein, procollagen to assess the risk of ventricular tachycardia in ICD recipients after myocardial infarction. *Europace*. 2007;9:724-729.
- 293. Pelliccia A, Maron BJ, De Luca R et al. Remodeling of left ventricular hypertrophy in elite athletes after long-term deconditioning. *Circulation*. 2002;105:944-949.
- 294. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:1550-1558.
- 295. Anne W, Willems R, Roskams T et al. Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2005;67:655-666.
- 296. Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*. 1997;96:4065-4082.
- 297. Zhou G, Kandala JC, Tyagi SC et al. Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem*. 1996;154:171-178.
- 298. Dostal DE. Regulation of cardiac collagen: angiotensin and cross-talk with local growth factors. *Hypertension*. 2001;37:841-844.
- 299. Molina-Molina M, Serrano-Mollar A, Bulbena O et al. Losartan attenuates bleomycin induced lung fibrosis by increasing prostaglandin E2 synthesis. *Thorax*. 2006;61:604-610.
- 300. Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Blockade of renin-angiotensin system in antifibrotic therapy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22 Suppl 1:S93-S95.
- 301. Casale PN, Devereux RB, Milner M et al. Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men. *Ann Intern Med.* 1986;105:173-178.
- 302. Levy D, Garrison RJ, Savage DD et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990;322:1561-1566.

- 303. Avanza AC, Jr., Mansur AP, Ramires JA. Efficacy of exercise, losartan, enalapril, atenolol and rilmenidine in subjects with blood pressure hyperreactivity at treadmill stress test and left ventricular hypertrophy. *J Hum Hypertens*. 2009;23:259-266.
- 304. Cuspidi C, Muiesan ML, Valagussa L et al. Comparative effects of candesartan and enalapril on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension: the candesartan assessment in the treatment of cardiac hypertrophy (CATCH) study. *J Hypertens*. 2002;20:2293-2300.
- 305. Chen K, Mehta JL, Li D et al. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res.* 2004;95:1167-1173.

## APÈNDIX



# Circulation

# Circulation

Cardiac Arrhythmogenic Remodeling in a Rat Model of Chronic Intensive Exercise Training. Begoña Benito, Gemma Gay-Jordi, Anna Serrano-Mollar, Eduard Guasch, Yanfen Shi, Jean-Claude Tardif, Josep Brugada, Stanley Nattel, and Lluís Mont CIRCULATIONAHA/2010/938282 [R1]

This information is current as of July 2, 2010

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed. Downloaded from http://submit-circ.ahajournals.org on July 2, 2010

### Author Disclosures

Begoña Benito: No disclosures Gemma Gay-Jordi: No disclosures Anna Serrano-Mollar: No disclosures Eduard Guasch: No disclosures Yanfen Shi: No disclosures Jean-Claude Tardif: No disclosures Josep Brugada: No disclosures Stanley Nattel: No disclosures Lluís Mont: No disclosures Cardiac Arrhythmogenic Remodeling in a Rat Model of Chronic Intensive Exercise Training

#### Short title: Cardiac remodeling cause by intensive exercise

Begoña Benito, MD<sup>1,2,3</sup>, Gemma Gay-Jordi, BSc<sup>2,4</sup>, Anna Serrano-Mollar, PhD<sup>2,4</sup>, Eduard Guasch, MD<sup>1,2</sup>, Yanfen Shi, MD<sup>3</sup>, Jean-Claude Tardif, MD<sup>3</sup>, Josep Brugada, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Stanley Nattel<sup>†</sup>, MD<sup>3</sup>, Lluis Mont<sup>†</sup>, MD, PhD<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>The Thorax Institute. Hospital Clínic. Universitat de Barcelona. Barcelona, Catalonia (Spain). <sup>2</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS). Barcelona, Catalonia (Spain). <sup>3</sup>Research Center. Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Quebec (Canada). <sup>4</sup>Department of Experimental Pathology. Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB). Barcelona, Catalonia (Spain).

\*Begoña Benito and Gemma Gay-Jordi share first-authorship. <sup>†</sup>Lluis Mont and Stanley Nattel share senior authorship.

#### Address for correspondence:

Dr. Anna Serrano-Mollar

c/Rosselló,161. 08036–Barcelona (Spain). Tel:(+34)933638307. Fax:(+34)933638301. e-mail: amsbam@iibb.csic.es

*Word count:* 5996 (excluding Word Count, short title and subject code)

Subject code: [130] Animal models of human disease

## **Clinical Perspective**

Despite the well-recognized benefits of exercise-training in healthy individuals and in patients with cardiovascular disease, there has been increasing evidence suggesting that chronic highlevel exercise practice (as in athletic contexts) can increase the risk of developing cardiac arrhythmias. Both atrial tachyarrhythmias (particularly atrial fibrillation) and (much more rarely) potentially-malignant ventricular arrhythmias have been associated with sustained high-level endurance training. There have been debates about whether these arrhythmias are due to undiagnosed underlying cardiac arrhythmogenic diseases, with chronic exercise being a triggering factor, or whether high-intensity chronic exercise can actually be a primary cause of arrhythmia susceptibility. To provide insights into the ability of sustained high-level exercise to cause arrhythmogenic cardiac remodeling, we applied an experimental model in which male rats were trained to run vigorously 1 hour daily for 16 weeks, and compared to a parallel group of sedentary control rats. We found that intense chronic exercise induced morphological and functional changes characteristic of the "athlete's heart" as described in humans, along with extracellular-matrix changes and fibrosis affecting all chambers except the left ventricle. Ventricular arrhythmia susceptibility to programmed electrical stimulation was enhanced in exercise-trained rats. The fibrotic changes caused by16 weeks of vigorous exercise-training were reversible within several weeks of exercise cessation. These results, if confirmed in humans, suggest that chronic vigorous endurance exercise-training may cause cardiac remodeling that serves as a substrate for arrhythmia-vulnerability. Our findings may have important potential implications for arrhythmia risk assessment and management in individuals performing high-level exercise-training.

#### ABSTRACT

**Background:** Recent clinical studies suggest that endurance sports may promote cardiac arrhythmias. The aim of this study was to use an animal model to evaluate whether sustained intensive exercise-training induces potentially-adverse myocardial remodeling, and thus creates a potential substrate for arrhythmias.

**Methods and Results:** Male Wistar rats were conditioned to run vigorously for 4, 8 and 16 weeks, while time-matched sedentary rats served as controls. Serial echocardiograms and in vivo electrophysiological studies at 16 weeks were obtained in both groups. After euthanasia, ventricular collagen deposition was quantified by histological and biochemical studies, and mRNA and protein expression of TGF- $\beta$ 1, fibronectin-1, MMP-2, TIMP1, procollagen-I and procollagen-III were evaluated in all four cardiac chambers. At 16 weeks, exercise rats developed eccentric hypertrophy and diastolic dysfunction, together with atrial dilation. In addition, collagen deposition in the right ventricle (RV) and mRNA and protein expression of fibrosis markers in both atria and RV were significantly greater in exercise than in sedentary rats at 16 weeks. Ventricular tachycardia could be induced in 5/12 (42%) of exercise rats versus only 1/16 (6%) of sedentary rats (p=0.05). The fibrotic changes caused by 16 weeks of intensive-exercise were reversed following 8-week exercise cessation.

**Conclusions:** In this animal model, we documented cardiac fibrosis following longterm intensive exercise-training, together with changes in ventricular function and increased arrhythmia inducibility. If our findings are confirmed in humans, the results would support the notion that chronic vigorous endurance exercise-training may in some cases promote adverse remodeling and produce a substrate for cardiac arrhythmias.

Key words: Exercise, myocardial fibrosis, arrhythmia.

#### INTRODUCTION

Regular physical activity confers benefits that are widely recognized, such as improved cardiovascular risk-profiles and prevention of coronary heart disease and diabetes.<sup>1,2</sup> Regular exercise also directly and positively affects cardiac physiology (e.g. increased myocardial oxygen supply and enhanced myocardial contractility), both in the general population<sup>3</sup> and in patients with cardiovascular disease.<sup>4</sup>

Chronic exercise induces hemodynamic changes and alters the loading conditions of the heart, with specific effects depending on the type of sport and intensity, that are most evident among athletes.<sup>5</sup> Cardiac adaptations in highly-trained subjects include increased left (LV) and right ventricular (RV) diameters, enlarged left atrial (LA) dimensions and increased cardiac mass and LV wall-thickness.<sup>5,6</sup> These changes, together with a preserved ejection fraction, have classically characterized the physiology of the "athlete's heart".<sup>5</sup>

Despite the evident benefits of an active lifestyle,<sup>1-4</sup> numerous observational studies have raised concerns that high-level exercise-training may be associated with increased cardiac-arrhythmia risk and even primary cardiac arrest.<sup>7</sup> Initial observations from our group and others,<sup>8-13</sup> later confirmed by a large epidemiological study,<sup>14</sup> have shown that long-lasting endurance training may promote atrial fibrillation (AF). Complex ventricular tachyarrhythmias (VTs) can also occur in highly-trained individuals,<sup>15</sup> which according to recent studies<sup>16,17</sup> often originate from a mildly dysfunctional RV, even after excluding RV pathologies like arrhythmogenic RV cardiomyopathy.

These findings raise the possibility that chronic endurance exercise may promote the development of certain cardiac arrhythmias. Some authors have speculated that the cardiac remodeling following sustained physical activity may create an arrhythmogenic substrate.<sup>8,17</sup> Although information on athletes is insufficient, arrhythmia susceptibility has been extensively related to myocardial fibrosis in other clinical contexts.<sup>18</sup> Tissue-fibrosis appears as a reparative process for damaged myocardial parenchyma and

results in accumulation of fibrillar collagen deposits, which may favor reentry and consequently arrhythmogenicity.<sup>18</sup>

The present study was designed to develop a rat model of chronic, intensive endurance exercise, to test whether regular intense physical training can induce cardiac structural changes, particularly fibrosis, thereby generating a substrate for cardiac arrhythmias.

#### METHODS

#### Experimental design

This study conformed to European Community (Directive 86/609/EEC), Spanish and Canadian guidelines for the use of experimental animals and was approved by the institutional animal research ethics committees. Pathogen-free, 4-week old, male Wistar rats weighing 100-125 g (Charles River) were housed in a controlled environment (12:12-h light-dark cycle) and fed rodent chow/tap water *ad libitum*.

Animals were randomly assigned to sedentary (Sed) or intensive-exercise (Ex) groups. To assess time-course changes, animals in both groups were studied at 4, 8 and 16 weeks. The exercise program was based on a previously-validated protocol.<sup>19</sup> Ex rats underwent daily running training sessions on a treadmill. The treadmill had different lanes to serve as corridors for each animal and had a grid in the back that administered a small electrical shock on contact to ensure that animals ran effectively. The electrical shock was of constant intensity (0 to 2 mA), sufficient to encourage the animal to run without being harmful. The protocol included a 2-week progressive training-program, starting with a 10-min running session at 10 cm/s and increased gradually to steady-state 60-min running at 60 cm/s. Thereafter, animals were trained at this level five days a week for 4, 8 or 16 weeks. Investigators observed the treadmill sessions daily to ensure effective running. Only rats that mastered the running training and ran spontaneously with a maximum cumulative shock-time of 15 s per 1-hour training-session were included in the study. Sedentary rats were housed and fed in the same conditions.

An additional series of rats underwent 16 weeks of training followed by discontinuation of exercise (DEx) to assess the reversibility of exercise-induced changes. DEx-rats were assessed after 2, 4 or 8 weeks of exercise-cessation. Sedentary rats housed and fed in the same conditions over the same period served as DEx-controls. Animals were sacrificed three days after the end of the training program to avoid acute responses, or after 2, 4 or 8 weeks from last running-session in DEx groups. Hearts were quickly removed, weighed, dissected into LV, RV, LA and right atrium (RA) and then frozen in liquid nitrogen at -80°C, or fixed for histological studies.

For detailed methods of echocardiography, electrophysiological study, tissue imaging and biochemical studies, see Online Data Supplement.

#### Statistical analysis

Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was generally carried out with two-way ANOVA. For heart-weight and hydroxyproline experiments, exercise and time-point were main effects. Morphometric, RT-PCR and echocardiographic results were analyzed with two-way, repeated-measures ANOVA, using exercise as one main effect and either cardiac chamber (morphometric and RT-PCR experiments) or time-point (echocardiography) as the repeated-measures main effect. Picrosirius-red and hydroxyproline deconditioning studies were analyzed with one-way ANOVA. In the case of a significant interaction by 2-way ANOVA or a significant difference on 1-way ANOVA, Bonferroni-corrected t-tests were used to assess Sed versus Ex group-differences. In the absence of interaction, P-values are shown for significant main-effect differences. Ex versus Sed immunoblots and electrophysiological-testing results were compared with t-tests for non-paired samples. Fisher's exact test was used to compare frequency-variables. Detailed specifications of statistical analysis in each figure are provided in the Online Supplement. Two-tailed P<0.05 was considered significant.

#### RESULTS

#### Cardiac remodeling following chronic intensive exercise-training

Cardiac mass was significantly increased in Ex groups at all time-points (Figure 1A). Values for individual cardiac chambers, available at 16 weeks, were significantly increased in Ex-rats (Table 1). No significant changes were observed in the LV/RV mass ratio. Direct measurement of wall thickness (WT) (Figure 1B) confirmed significant increments in post-mortem interventricular septum (IVS) and LV free-wall (FW)-thickness after 8 weeks of intensive-exercise, which were maintained at 16 weeks (Figure 1C). No significant differences were observed in RV FW-thickness.

To evaluate further cardiac morphological and functional adaptation to chronic intensive-exercise, serial echocardiograms were performed in a subset of Ex and Sed rats. Because morphological LV-hypertrophy was not observed before 8 weeks, echocardiograms were performed only at baseline and after 8 and 16-week training. Ex-rats developed concentric LV-hypertrophy at 8 weeks, manifested by increased LV wall-thicknesses and IVS/LVDd ratio (for definition of echocardiographic abbreviations and results, see Table 2), evolving to eccentric hypertrophy/ventricular dilatation at 16 weeks. Ex-rats also showed evidence of LV diastolic dysfunction at 8-16 weeks (decreased S-wave in pulmonary-vein flow, increased IVRTc), along with LA-enlargement. A slight but statistically-significant decrease in LV systolic function was also observed in Ex-rats at 16 weeks. Evidence of RV diastolic dysfunction also occurred at 8-16 weeks (decreased E-wave velocity, prolonged E DT).

#### Intensive exercise-training promotes chamber-specific ultrastructural remodeling

We next evaluated tissue-fibrosis. Figure 2A shows representative photomicrographs of picrosirius-red stained RV-sections from Sed and Ex rats. Diffuse interstitial collagen deposition associated with disturbances in myocardial architecture was observed in RV

FWs of Ex-rats after 16-week training. No differences were observed in the LV (Online Figure 1A). Morphometric quantification confirmed a gradual increase in RV-FW collagen with training (Figure 2B). No differences in collagen-density were observed in IVS or LV-FW. Increased collagen in the RV of Ex-rats at 16 weeks was also noted on Masson Trichrome-stained images (Figure 3A).

To independently quantify fibrous-tissue content, the amount of hydroxyproline, a modified amino acid specifically found in collagen, was determined. After 16 weeks of intensive-exercise, animals showed significant increases in RV hydroxyproline-content (Figure 3B), with no significant differences observed in LV (Online Figure 1).

Messenger-RNA expression of TGF- $\beta$ 1, fibronectin-1, MMP-2, TIMP1, procollagen-I and procollagen-III was measured in all cardiac chambers of Sed and Ex groups. After 4 and 8-week exercise, no significant changes were observed (Online Table 1). The results at 16 weeks are shown in Figure 4. TGF- $\beta$ 1, fibronectin-1 and MMP-2 mRNAexpression was significantly increased in RA, LA and RV of Ex rats compared to Sed (Figures 4A, 4B and 4C respectively). The only significant difference for TIMP1 mRNAexpression was found in RA (Figure 4D). Finally, mRNA-expression of procollagen-I was significantly increased in RA and RV of Ex rats (Figure 4E), whereas procollagen-I III was significantly increased in both RA and LA of Ex rats (Figure 4F).

Alterations in protein-expression corresponding to mRNA-changes were assessed by Western-blot analysis for TGF-β1, fibronectin-1, MMP-2, TIMP1, collagen-I and collagen-III. TGFβ-1 protein-levels were significantly increased in both atria and RV of Ex rats (Figure 5A). Fibronectin showed no significant changes (Figure 5B). MMP-2 protein-expression was significantly increased in RA and LA of Ex-rats (Figure 5C) whereas TIMP1 was unchanged (Figure 5D). In parallel with results for procollagen-I mRNA-expression, collagen-I protein-levels were significantly greater in both RA and RV of Ex rats (Figure 5E); however, collagen-III was unchanged (Figure 5F).

8

These results confirm the development of significant extracellular-matrix (ECM) changes after 16-week intensive-endurance exercise, with fibrosis clear in the RV but not LV.

#### Chronic intensive-exercise increases ventricular arrhythmia-vulnerability

We then evaluated whether ventricular remodeling by 16-week Ex led to changes in electrophysiological parameters and/or arrhythmia susceptibility. In vivo electrophysiological study was performed with a customized catheter inserted into the RV apex. Ex rats showed evidence of a slight delay in ventricular conduction, manifested by longer QRS-duration (Table 3). No changes were noted in repolarization based on ventricular effective refractory periods. During programmed stimulation with up to 3 extrastimuli, sustained VT (>10 s) was induced in 5/12 (42%) of Ex rats versus 1/16 (6%) of Sed rats (p=0.05, Figure 6).

#### Remodeling reverses with detraining

To determine whether potentially-adverse ventricular remodeling is reversible after exercise-cessation, we compared rats allowed to recover after discontinuation of exercise (DEx groups) to age-matched Sed controls. Although showing some regression, cardiac mass remained significantly greater in all DEx groups compared to their Sed counterparts (Figure 7A).

Since all Sed groups (Sed 16 weeks, and Sed-DEx2, Sed-DEx4 and Sed-DEx8) presented equivalent data (not shown), for morphometric measurements, hydroxyproline levels, histology and mRNA analyses, results for the 16-week Sed group were used for comparisons. Wall-thickness increases induced by 16 weeks of intensive-exercise resolved progressively in both IVS and LV-FW (Figure 7B). In

contrast, no differences in RV wall-thicknesses were found among Ex, Sed and all DEx groups.

We then evaluated whether the fibrotic changes induced by 16 weeks of intensiveexercise were also reversed by exercise-discontinuation. Histopathology studies with Masson's Trichrome and picrosirius red confirmed a gradual decrease in collagen content during deconditioning (Figures 7C and 7D). Similarly, collagen quantification based on image-analysis of picrosirius-red stained tissues confirmed regression of fibrosis in the RV following deconditioning (Figure 7E). Correspondingly, hydroxyproline content in RV decreased progressively during deconditioning, and became nonsignificantly-different from Sed rats and significantly lower than in Ex rats at 16 weeks after exercise-cessation (Figure 7F). In accordance with these results, mRNA studies showed significant reversal in exercise-enhanced profibrotic markers within 2 weeks of deconditioning (Figure 8). Together, these results suggest substantial reversibility of vigorous endurance training-induced cardiac remodeling following the cessation of exercise-training.

#### DISCUSSION

The present study describes cardiac remodeling in a rat model of chronic, intensive exercise-training, demonstrating changes in cardiac function, fibrous-tissue content, fibrotic markers and arrhythmia susceptibility following chronic endurance training, with substantial reversibility following exercise-cessation. If results are similar in humans, then our findings suggest that chronic, intensive exercise can promote chamberspecific remodeling and provide a substrate for arrhythmogenesis.

#### Cardiac remodeling following intense endurance exercise-training

As previously described in other models,<sup>19-21</sup> we found significant LV hypertrophy at 8 weeks of training. At 16 weeks, LV dilatation was also observed, leading to eccentric hypertrophy. LV hypertrophy may have accounted for the impaired diastolic function observed after 8 and 16 weeks of exercise, which in turn was associated with LA dilatation. All these findings are consistent with the features of the "athlete's heart" described in humans,<sup>5</sup> and support the potential relevance of our training program. Of note, we also observed RV diastolic dysfunction, with a trend to RV dilatation and systolic dysfunction after 16 weeks of exercise, findings that have recently been described in high-level endurance-sport practitioners.<sup>17</sup>

#### Chamber-specific myocardial fibrosis after intensive exercise-training

Perhaps our most noteworthy finding is the demonstration of myocardial fibrosis following long-term, intensive exercise-training. RV-fibrosis was documented by collagen quantification in histological sections and analysis of hydroxyproline content. These observations were functionally paralleled by the development of RV diastolic dysfunction, with impaired relaxation potentially related to fibrotic infiltration. Moreover, we noted an increase in mRNA and protein-expression of a series of fibrotic markers in

the RV as well as in both atria. TGF- $\beta$ 1 expression was increased in RA, LA and RV after 16 weeks of intensive-exercise. TGF-B1 is a potent stimulator of collagenproducing cardiac myofibroblasts<sup>22</sup> and leads to fibrosis development. Experimental studies have reported that both genetic ablation of TGF-<sup>β</sup>1 in mice<sup>23</sup> and treatment with anti-TGF-B1 antibodies<sup>24</sup> inhibit fibrosis development, indicating that TGF-B1 plays a major role in collagen turnover. We also noted enhanced expression of other major components of the ECM control system, including fibronectin-1, collagens, MMP2 and its inhibitor TIMP1. Collagen-I determines the stiffness of cardiac muscle, whereas collagen-III is more distensible. Thus, the collagen-I/collagen-III ratio can be a marker of the ECM-determinants of cardiac stiffness.<sup>25</sup> We observed a significant increase in collagen-I protein-expression in right-sided cardiac chambers following 16 weeks of intensive-exercise, whereas collagen-III expression remained unchanged, indicating that chronic, intensive exercise could increase cardiac stiffness in these chambers via altered ECM-composition, a notion that was supported by echocardiographic evidence of diastolic dysfunction. These findings were accompanied by over-expression of mRNA and protein levels of MMP2. MMP2 is a proteolytic enzyme: activation of MMP2 induces disruption of ECM proteins and promotes fibrogenesis. Together, these results indicate the presence of a milieu favoring the development of myocardial interstitial fibrosis, characterized by alterations in fibroblast growth factors and ECM imbalance.

Although extensive data have been published on echocardiographic remodeling with exercise,<sup>6,26</sup> less information is available regarding cardiac histological and biochemical remodeling in endurance athletes. A recent study demonstrated increased turn-over of fibrosis markers in plasma from veteran athletes,<sup>27</sup> although cardiac origin was not assessed. Data in abstract form also suggest the development of ventricular fibrosis based on magnetic-resonance imaging in endurance athletes.<sup>28</sup> Our finding of cardiac fibrosis represents the first direct evidence of potentially-adverse cardiac remodeling following long-term, intensive exercise.

The mechanisms by which chronic, intensive exercise may promote cardiac fibrosis are unknown. It is possible that long-term cardiac overload plays a role by promoting physiological remodeling in early phases that may eventually become maladaptative in the long term. Experimental studies support the idea that physiological and pathological cardiac remodeling involve different signaling pathways,<sup>29</sup> but recent data have demonstrated that excessive stimulation of physiological systems can result in maladaptative responses.<sup>30,31</sup> Whether this or other mechanisms are involved in the profibrotic cardiac remodeling observed in our model is a matter to be addressed in future studies.

Of note, tissue fibrosis in this model of chronic, intensive exercise was chamberspecific, since the LV did not appear to be affected. There are two potential explanations for this finding. First, assuming that exercise increases loading conditions on all cardiac chambers,<sup>5</sup> it is reasonable to suppose that greater profibrotic remodeling develops in chambers suffering greater degrees of overload. In this regard, clinical studies have described higher loading conditions on the RV than on the LV during endurance sports,<sup>32</sup> leading to transient RV dysfunction immediately following exercise.<sup>33</sup> Second, it has been suggested that intrinsically-thinner walls could make the atria, and also the RV, more susceptible to remodeling.<sup>17,18</sup> The absence of significant fibrosis in the LV agrees with previous models of chronic exercise<sup>20,21</sup> and supports the normal functionality of the LV of the "athlete's heart".<sup>5</sup> Supporting this idea, an animal model of chronic volume overload with similarities to loading-condition changes in endurance training showed regional over-expression of growth factors and increased collagen deposition in the RV but not the LV.<sup>34</sup>

#### Intense exercise-training and arrhythmogenic remodeling

Despite its benefits for overall health,<sup>1-4</sup> numerous clinical studies in recent vears have suggested that chronic high-level exercise might be associated with an increased risk of cardiac arrhythmias, mainly AF and ventricular arrhythmias originating from the RV.8-<sup>16</sup> One important aspect of this study is that the remodeling observed after chronic, intensive exercise-training could represent a potential substrate for arrhythmias. Cardiac fibrosis and associated myocardial disarray provide electrical heterogeneity and promote reentrant circuits and arrhythmogenesis.<sup>18</sup> It has been reported that atrial over-expression of TGF-B1 in transgenic mice is sufficient to generate a fibrotic substrate that supports AF.<sup>35</sup> Similarly, increases in procollagen and MMPs have been related to increased risks of atrial and ventricular arrhythmias.<sup>36-38</sup> We assessed this hypothesis by evaluating the inducibility of ventricular arrhythmias during in vivo programmed-stimulation studies, and noted inducible sustained VT in 42% of rats subjected to intensive exercise for 16 weeks, compared to only 6% of sedentary rats. In the presence of increased QRS duration, indicating ventricular conduction-slowing, and the absence of changes in electrophysiological parameters reflecting repolarization like ventricular refractory period, these results suggest that the cardiac fibrosis observed in our model could play a role in producing the increased arrhythmia susceptibility we observed in exercise rats.

#### Reversibility

Clinical studies have reported regression of the morphological changes characteristic of the "athlete's heart" after long-term detraining.<sup>39</sup> The reversibility of arrhythmogenic remodeling is of potentially great clinical importance, because it would imply that deleterious rhythm consequences of long-term endurance training can be expected to disappear following cessation of intense physical training. We accordingly assessed whether a period of rest could allow for reversion of the profibrotic changes induced by

endurance training in our model. The results of our exercise-discontinuation study demonstrate that, after 8 weeks of detraining, virtually all the abnormal cardiacremodeling parameters resulting from intense exercise-training regressed to control levels.

More studies will be needed to ascertain the mechanisms that participate both in the promotion and the reversal of the fibrotic remodeling associated with long-term exercise and detraining, respectively. In addition, follow-up clinical studies are indicated to establish whether similar remodeling changes can be demonstrated in humans, and if so whether they are reversible.

#### Potential Limitations

We cannot exclude the possibility that our exercise-training protocol involving conditioning shocks might have induced emotional stress in Ex-rats. Maximum efforts were taken to minimize stress responses. Rats that did not adapt to treadmill exercise or received excessive shocks (>15 s/hour) were excluded from the study.

It is difficult to estimate precisely how our exercise program translates into human activity. As a rough approximation, considering that the typical rat life-expectancy is 2-2.5 years, our 18-week exercise protocol (2 weeks of progressive training + 16 weeks of intensive exercise) would be equivalent to ~10 years of daily exercise-training in humans. According to previous studies in rodents,<sup>40,41</sup> the intensity of our program would correspond to approximately 85% of maximum oxygen uptake, equivalent to physical activity at about 90% of predicted maximum heart rate in man.<sup>42</sup> Our results, therefore, cannot be directly extrapolated to more mild or moderate forms of exercise. In addition, we only studied remodeling-reversal with complete exercise-cessation, which is unlikely in high-level athletes. Whether similar recovery is achieved by simply reducing the intensity of a training program is uncertain.

Only young male rats were tested in this study. Age- and gender-related factors could significantly influence exercise-related cardiac remodeling and were not analyzed in our study. Further work in other animal models, studies of age and gender effects on exercise-induced remodeling, and follow-up analyses in human populations would all be of great interest.

The functional consequences of cardiac remodeling have been specifically assessed by passive pressure-strain curves in papillary muscles or LV pressure-volume curves.<sup>43</sup> Because of limited availability of hearts and the need to obtain tissue-samples for histological and biochemical studies, we decided to study both functional and morphological consequences of chronic intensive exercise by performing serial echocardiograms, thus obtaining a maximum of information while being able to use each rat as its own control.

#### Conclusions

This study shows that long-term intense endurance-training promotes heart-chamber specific remodeling and ventricular arrhythmia susceptibility in an animal model. Cessation of endurance-training was able to arrest and even reverse this pathological process. These findings, if reproduced in humans, could have potentially-important implications for arrhythmia risk and its management in individuals involved in high-level athletic training and practice.

**Acknowledgments**: The authors thank Valeria Sirenko and Nathalie L'Heureux for excellent technical assistance, and Anna Nozza for statistical assistance.

**Funding Sources:** Grants from Sociedad Española de Cardiología, Fondo de Investigaciones Sanitarias from Instituto de Salud Carlos III (PI050210), Rio Hortega (CM06/00189 and CM08/00201) from Spanish Health Ministry, Universitats i Recerca

(2005SGR00497), Canadian Institutes of Health Research (MGP-6957) and ENAFRA network award from Fondation Leducq (07-CVD-03).

**Disclosures**: No relationships to disclose.

#### **Reference List**

- (1) Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Exercise type and intensity in relation to coronary heart disease in men. *JAMA*. 2002;288:1994-2000.
- (2) Hu FB, Sigal RJ, Rich-Edwards JW, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Speizer FE, Manson JE. Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study. *JAMA*. 1999;282:1433-9.
- (3) Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, Wenger NK. Exercise and Physical Activity in the Prevention and Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Statement From the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation*. 2003;107:3109-16.
- (4) Pina IL, Apstein CS, Balady GJ, Belardinelli R, Chaitman BR, Duscha BD, Fletcher BJ, Fleg JL, Myers JN, Sullivan MJ. Exercise and Heart Failure: A Statement From the American Heart Association Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention. *Circulation.* 2003;107:1210-25.
- (5) Fagard R. Athlete's heart. Br Heart J. 2003;89:1455-61.
- (6) Pelliccia A, Maron BJ, Di Paolo FM, Biffi A, Quattrini FM, Pisicchio C, Roselli A, Caselli S, Culasso F. Prevalence and clinical significance of left atrial remodeling in competitive athletes. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:690-6.
- (7) Siscovick DS, Weiss NS, Fletcher RH, Lasky T. The incidence of primary cardiac arrest during vigorous exercise. *N Engl J Med.* 1984;311:874-7.
- (8) Mont L, Sambola A, Brugada J, Vacca M, Marrugat J, Elosua R, Pare C, Azqueta M, Sanz G. Long-lasting sport practice and lone atrial fibrillation. *Eur Heart J.* 2002;23:477-82.
- (9) Elosua R, Arquer A, Mont L, Sambola A, Molina L, Garcia-Moran E, Brugada J, Marrugat J. Sport practice and the risk of lone atrial fibrillation: A case-control study. *International Journal of Cardiology*. 2006;108:332-7.
- (10) Heidbuchel H, Anne W, Willems R, Adriaenssens B, Van de Werf F, Ector H. Endurance sports is a risk factor for atrial fibrillation after ablation for atrial flutter. *International Journal of Cardiology*. 2006;107:67-72.
- (11) Baldesberger S, Bauersfeld U, Candinas R, Seifert B, Zuber M, Ritter M, Jenni R, Oechslin E, Luthi P, Scharf C, Marti B, Attenhofer Jost CH. Sinus node disease and arrhythmias in the long-term follow-up of former professional cyclists. *Eur Heart J.* 2008;29:71-8.
- (12) Molina L, Mont L, Marrugat J, Berruezo A, Brugada J, Bruguera J, Rebato C, Elosua R. Long-term endurance sport practice increases the incidence of lone atrial fibrillation in men: a follow-up study. *Europace*. 2008;10:618-23.
- (13) Mont L, Tamborero D, Elosua R, Molina I, Coll-Vinent B, Sitges M, Vidal B, Scalise A, Tejeira A, Berruezo A, Brugada J. Physical activity, height, and left

atrial size are independent risk factors for lone atrial fibrillation in middle-aged healthy individuals. *Europace*. 2008;10:15-20.

- (14) Aizer A, Gaziano JM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Albert CM. Relation of vigorous exercise to risk of atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* 2009;103:1572-7.
- (15) Biffi A, Pelliccia A, Verdile L, Fernando F, Spataro A, Caselli S, Santini M, Maron BJ. Long-term clinical significance of frequent and complex ventricular tachyarrhythmias in trained athletes. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:446-52.
- (16) Heidbuchel H, Hoogsteen J, Fagard R, Vanhees L, Ector H, Willems R, Van Lierde J. High prevalence of right ventricular involvement in endurance athletes with ventricular arrhythmias: Role of an electrophysiologic study in risk stratification. *Eur Heart J.* 2003;24:1473-80.
- (17) Ector J, Ganame J, van der Merwe N, Adriaenssens B, Pison L, Willems R, Gewillig M, Heidbuchel H. Reduced right ventricular ejection fraction in endurance athletes presenting with ventricular arrhythmias: a quantitative angiographic assessment. *Eur Heart J.* 2007;28:345-53.
- (18) Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:802-9.
- (19) Fenning A, Harrison G, Dwyer D, Rose'Meyer R, Brown L. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. *Mol Cell Biochem.* 2003;251:51-9.
- (20) Woodiwiss A, Oosthuyse T, Norton G. Reduced cardiac stiffness following exercise is associated with preserved myocardial collagen characteristics in the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1998;78:148-54.
- (21) Rocha FL, Carmo EC, Roque FR, Hashimoto NY, Rossoni LV, Frimm C, Aneas I, Negrao CE, Krieger JE, Oliveira EM. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H3575-H3583.
- (22) Butt RP, Laurent GJ, Bishop JE. Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors. *Eur J Cell Biol.* 1995;68:330-5.
- (23) Brooks WW, Conrad CH. Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice. J Mol Cell Cardiol. 2000;32:187-95.
- (24) Tomita H, Egashira K, Ohara Y, Takemoto M, Koyanagi M, Katoh M, Yamamoto H, Tamaki K, Shimokawa H, Takeshita A. Early induction of transforming growth factor-beta via angiotensin II type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension.* 1998;32:273-9.
- (25) Norton GR, Tsotetsi J, Trifunovic B, Hartford C, Candy GP, Woodiwiss AJ. Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 1997;96:1991-8.
- (26) Maron BJ, Pelliccia A. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation.* 2006;114:1633-44.
- (27) Lindsay MM, Dunn FG. Biochemical evidence of myocardial fibrosis in veteran endurance athletes. *Br J Sports Med.* 2007;41:447-52.
- (28) Cocker M, Strohm O, Smith D, Butler C, Belenkie I, Meeuwisse W, Friedrich MG. Myocardial fibrosis is a prevalent finding in elite high-endurance athletes. *J Cardiovasc Magn Reson*. 11[(suppl1)], O68. 2009.
  - (29) Selvetella G, Hirsch E, Notte A, Tarone G, Lembo G. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc Res.* 2004;63:373-80.
  - (30) O'Neill BT, Abel ED. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe?. *J Clin Invest.* 2005;115:2059-64.
  - (31) Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115:2108-18.
  - (32) Douglas PS, O'Toole ML, Hiller WD, Reichek N. Different effects of prolonged exercise on the right and left ventricles. *J Am Coll Cardiol.* 1990;15:64-9.
  - (33) vila-Roman VG, Guest TM, Tuteur PG, Rowe WJ, Ladenson JH, Jaffe AS. Transient right but not left ventricular dysfunction after strenuous exercise at high altitude. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:468-73.
  - (34) Modesti PA, Vanni S, Bertolozzi I, Cecioni I, Lumachi C, Perna AM, Boddi M, Gensini GF. Different growth factor activation in the right and left ventricles in experimental volume overload. *Hypertension*. 2004;43:101-8.
  - (35) Verheule S, Sato T, Everett T, IV, Engle SK, Otten D, Rubart-von der Lohe M, Nakajima HO, Nakajima H, Field LJ, Olgin JE. Increased Vulnerability to Atrial Fibrillation in Transgenic Mice With Selective Atrial Fibrosis Caused by Overexpression of TGF-{beta}1. *Circ Res.* 2004;94:1458-65.
  - (36) Xu J, Cui G, Esmailian F, Plunkett M, Marelli D, Ardehali A, Odim J, Laks H, Sen L. Atrial Extracellular Matrix Remodeling and the Maintenance of Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2004;109:363-8.
  - (37) Mukherjee R, Herron AR, Lowry AS, Stroud RE, Stroud MR, Wharton JM, Ikonomidis JS, Crumbley AJ, III, Spinale FG, Gold MR. Selective induction of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in atrial and ventricular myocardium in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* 2006;97:532-7.
  - (38) Blangy H, Sadoul N, Dousset B, Radauceanu A, Fay R, Aliot E, Zannad F. Serum BNP, hs-C-reactive protein, procollagen to assess the risk of ventricular tachycardia in ICD recipients after myocardial infarction. *Europace*. 2007;9:724-9.
  - (39) Pelliccia A, Maron BJ, De LR, Di Paolo FM, Spataro A, Culasso F. Remodeling of left ventricular hypertrophy in elite athletes after long-term deconditioning. *Circulation.* 2002;105:944-9.

- (40) Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO(2 max) and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H1301-H1310.
- (41) Copp SW, Davis RT, Poole DC, Musch TI. Reproducibility of endurance capacity and VO2peak in male Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol.* 2009;106:1072-8.
- (42) Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R, Fleg J, Froelicher VF, Leon AS, Pina IL, Rodney R, Simons-Morton DA, Williams MA, Bazzarre T. Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 2001;104:1694-740.
- (43) Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Steendijk P, Hop WC, Schoemaker RG, Duncker DJ, Lamers JM, Helbing WA. Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H1580-H1586.

	Sedentary (n=9)	Exercise (n=10)
RA/BW (g/Kg)	0.091±0.006	0.144±0.020*
LA/BW (g/Kg)	0.083±0.010	0.153±0.020**
RV/BW (g/Kg)	0.357±0.019	0.433±0.029*
LV/BW (g/Kg)	1.837±0.057	2.212±0.098**
IVS (g/Kg)	0.444±0.026	0.644±0.100
LV FW (g/Kg)	1.394±0.052	1.568±0.160
LV/RV mass index	5.227±0.259	5.264±0.329

Table 1. Tissue mass in Sedentary and Exercise rats after 16 weeks of training.

\*p<0.05,\*\*p<0.01, non-paired t-test Exercise *vs* Sedentary. RA:right atrium; LA:left atrium; LV:left ventricle; IVS:interventricular septum; FW:free wall; BW:body weight.

$\sim$
à
ã
òò
õ
Ő
$\geq$
Ξ
ò
Ñ
_
$\sim$
Ľ

Table 2. Serial echocardiographic parameters in Exercise (Ex) and Sedentary (Sed) groups.

		Deceline		0 utocho		6 works
	Sed (n=11)	EX (n=12)	Sed (n=11)	EX (n=12)	Sed (n=11)	EX (n=12)
LV dimensions and function						
- LVDd/BW (cm/Kg)	3.01±0.07	3.01±0.05	1.59±0.04	1.72±0.03	1.39±0.05	1.63±0.02***
- LVDs/BW (cm/Kg)	1.43±0.07	1.51±0.06	0.79±0.03	0.86±0.03	0.72±0.03	0.94±0.03**
- IVS/BW (cm/Kg)	0.55±0.01	0.56±0.01	0.31±0.01	0.38±0.01***	0.29±0.01	0.36±0.01***
- PW/BW (cm/Kg)	0.54±0.01	0.54±0.01	0.30±0.01	0.35±0.01**	0.27±0.01	0.32±0.01***
- LV mass/BW (g/Kg)	2.68±0.11	2.68±0.07	1.93±0.04	2.14±0.05	1.76±0.06	2.13±0.07**
- IVS/LVDd*	0.19±0.01	0.19±0.00	0.20±0.01	0.22±0.00	0.21±0.01	0.22±0.01
- EF(%)	86.99±1.45	85.19±1.31	85.74±0.92	85.66±1.02	83.85±1.02	77.89±1.54**
- S wave PV (cm/s)	32.44±1.53	32.71±1.53	33.39±1.48	31.93±1.45	37.06±1.46	30.45±1.20**
- IVRTc (ms)	1.21±0.06	1.12±0.07	1.21±0.06	1.43±0.07*	1.29±0.05	1.49±0.06
RV dimensions and function						
- RVD/BW (cm/Kg)	1.29±0.03	1.27±0.05	0.68±0.02	0.72±0.03	0.60±0.02	0.69±0.02
- RWVT/BW (cm/Kg)	0.10±0.02	0.11±0.03	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01
- TAPSE (cm)	3.38±0.68	3.16±0.14	3.41±0.11	3.61±0.09	3.80±0.09	3.43±0.09
- Sm (cm/s)	8.13±0.68	8.57±0.40	9.42±0.45	9.21±0.47	10.37±0.59	8.99±0.36
<ul> <li>E veloc (cm/s)*</li> </ul>	75.60±3.51	74.88±2.31	76.61±5.50	60.76±4.27	63.81±3.63	49.55±3.41
- E DT (ms)	36.54±1.48	33.15±2.07	34.43±1.39	35.69±3.28	28.49±2.04	44.07±4.31***
- E/A ratio	1.08±0.06	1.20±0.07	1.03±0.05	0.88±0.07	1.03±0.06	0.87±0.05
Atrial dimensions						
- LADs/BW (cm/Kg)	1.83±0.04	1.87±0.03	0.98±0.03	1.13±0.02**	0.89±0.03	1.14±0.02***
*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001 E>	x vs Sed. Two-wa	ay repeated-measures	ANOVA. LVDd:LV di	ameter at end-diastole	e; LVDs:LV diameter	at end-systole;
IVS:Interventricular septum wal	II thickness; PW:F	osterior wall thicknes	s; EF:ejection fraction	; PV:Pulmonary vein; I	VRTc:LV isovolumic	crelaxation time
corrected for R-R; RVD:RV diai	meter at end-dias	tole; RVWT:RV wall th	hickness; TAPSE:Tric	uspid annulus plane sy	stolic excursion; Sn	n:RV lateral wall

systolic motion-velocity; E DT:E-wave deceleration time; LADs:left-atrial diameter at end-systole.

23

# R1 2010/938282

**Table 3.** Ventricular electrophysiological parameters at 16 weeks.

	Sedentary (n=10)	Exercise (n=11)
QRS duration (ms)	23.5±0.4	25.2±0.6*
V-duration (ms)	17.1±0.5	18.2±0.6
VERP (ms)	39.8±1.1	43.2±1.3

\*p<0.05, non-paired t-test Ex *vs* Sed group. V-duration:ventricular-electrogram duration; VERP:ventricular effective refractory period.

### FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** (A) Mean±SEM cardiac mass-changes indicated by heart weight/body weight (HW/BW) ratios. (Sed: n=4, 4, 6 for 4, 8, 16 weeks respectively; Ex: n=5, 5, 8 for 4, 8, 16 weeks; two-way ANOVA). (B) Schema indicating areas studied for ventricular-hypertrophy assessment. (C) Mean±SEM ventricular wall-thickness (WT) indexed to body weight (BW). LV FW=Left-ventricular free-wall; IVS=interventricular septum; RV FW=Right-ventricular free-wall. (n=4 rats/group; two-way ANOVA, repeated measure=region). \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001, for Bonferroni-adjusted t-test (correction-factor-3), Ex *vs* Sed.

**Figure 2:** (A) Picrosirius-stained photomicrographs of right-ventricular sections. At 16-week Ex, there is widespread interstitial collagen deposition with disarray of myocardial architecture (arrow). (B) Mean±SEM collagen content in right-ventricular free-wall (RV FW), interventricular septum (IVS) and left-ventricular free-wall (LV FW). (n=4/group/time-point; two-way ANOVA, repeated measure=region).\*p<0.05, for Bonferroni-adjusted t-test (correction-factor=3), Ex *vs* Sed.

**Figure 3:** (A) Masson Trichrome-stained photomicrographs of right-ventricular sections. Increased collagen deposition (blue staining, arrow) is present in Ex group at 16 weeks. (B) Mean±SEM hydroxyproline-content in right-ventricular free-wall (RV FW). n=4 (Sed, 4 and 8 weeks), n=6 (Sed, 16 weeks), n=5 (Ex, 4 and 8 weeks) and n=8 (Ex 16 weeks); two-way ANOVA, no repeated measures. \*\*\*p<0.001 for Bonferroni-adjusted t-test (correction-factor=3), Ex *vs* Sed.

**Figure 4:** Mean±SEM mRNA-expression of fibrotic markers (A) TGF- $\beta$ 1, (B) fibronectin-1, (C) MMP2, (D) TIMP1, (E) procollagen-I, and (F) procollagen-III at 16 weeks in Sed and Ex groups, quantified by real-time PCR and normalized to  $\beta$ -actin. n=6 (Sed) and n=8 (Ex); two-way ANOVA, repeated measure=region.. \*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001 for Bonferroni-adjusted t-test (correction-factor=4), Ex *vs* Sed.

**Figure 5:** Mean±SEM protein-levels of fibrotic markers (A) TGF- $\beta$ 1, (B) fibronectin-1, (C) MMP2, (D) TIMP1, (E) collagen-I, (F) collagen-III, analyzed by immunoblot (examples shown above bar-graphs) and normalized to  $\beta$ -actin in Sed and Ex groups at 16 weeks. n=6 (Sed) and n=8 (Ex); non-paired t-test,\*p<0.05,\*\*p<0.01 Ex *vs* Sed.

**Figure 6**: (A) Inducibility of sustained (>10-s) ventricular arrhythmias by programmed electrical stimulation; Fisher's exact test, Ex *vs* Sed. (B) An example of polymorphic VT-induction by ventricular stimulation in an Ex rat.

**Figure 7:** Reversibility of remodeling. Sed=time-matched sedentary control for 16-wk Ex and 2-, 4-, 8week exercise-cessation for DEx2, DEx4, DEx8 in panel A, and time-matched sedentary control for 16week Ex in other panels. (A) Mean±SEM heart weight/body weight (HW/BW) ratio (two-way ANOVA, no repeated measure; Bonferroni correction factor=7). (B) Mean±SEM wall-thickness/body-weight ratio (twoway ANOVA, repeated measure=region; Bonferroni correction-factor=21). (C) Right-ventricular Masson Trichrome-stained photomicrographs. (D) Picrosirius red-stained photomicrographs. (E) Mean±SEM collagen-content (picrosirius red). (F) Mean±SEM hydroxyproline content in RV. E-F analyses: one-way ANOVA; Bonferroni correction-factor=7. \*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001 Ex vs Sed. †p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001 DEx vs Ex by Bonferroni-adjusted t-test.

**Figure 8:** Mean±SEM mRNA-expression of fibrotic markers (A) TGF- $\beta$ 1, (B) fibronectin-1, (C) MMP2, (D) TIMP1, (E) procollagen-I, and (F) procollagen-III at 16 weeks in Sed and Ex groups and in all DEx groups, quantified by real-time PCR and normalized to  $\beta$ -actin. n=4 (Sed) and n=6 (Ex and all DEx groups). Two-way ANOVA, repeated measure=region. \*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001, Bonferroni-adjusted t-test, (correction factor=7) for main-effect group comparisons.



Figure 1







Figure 4



Figure 5



Figure 6



Figure 7



Figure 8

# **ONLINE DATA SUPPLEMENT**

Cardiac Arrhythmogenic Remodeling in a Rat Model of Chronic Intensive Exercise Training

Begoña Benito, MD<sup>1,2,3</sup>, Gemma Gay-Jordi, BSc<sup>2,4</sup>, Anna Serrano-Mollar, PhD<sup>2,4</sup>, Eduard Guasch MD<sup>1,2</sup>, Yanfen Shi, MD<sup>3</sup>, Jean-Claude Tardif, MD<sup>3</sup>, Josep Brugada, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Stanley Nattel, MD<sup>3</sup>, Lluis Mont, MD, PhD<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>The Thorax Institute. Hospital Clínic. Universitat de Barcelona. Barcelona, Catalonia (Spain). <sup>2</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS). Barcelona, Catalonia (Spain). <sup>3</sup>Research Center. Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Quebec (Canada). <sup>4</sup>Department of Experimental Pathology. Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB). Barcelona, Catalonia (Spain).

Begoña Benito and Gemma Gay-Jordi contributed equally and share first-authorship. Lluis Mont and Stanley Nattel share senior authorship.

# Supplementary Methods, Figure legends, Figures and Tables

## SUPPLEMENTARY METHODS

### Echocardiography

Transthoracic echocardiographic studies were performed at baseline, 8 weeks, and 16 weeks in both exercise (Ex) and sedentary (Sed) groups, in all cases with the rats having been at rest during a minimum of 6 hours. The procedure was performed under general anesthesia with 2% isoflurane, using a phased-array probe 10S (4.5-11.5 Megaherz) in a Vivid 7 Dimension system (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Norway). The M-mode spectrum was traced in parasternal long axis view at the level of the aortic valve, left atrial dimension at end-cardiac systole (LADs) and right ventricular (RV) dimension (RVD) and wall thickness (RVWT) at endcardiac diastole were measured in this view. The M-mode spectrum was also obtained in parasternal short axis view at the level of papillary muscle, and left ventricular (LV) dimension at both end-cardiac diastole (LVDd) and systole (LVDs) were measured. The thickness of LV anterior wall and that of LV posterior wall at end-cardiac diastole were also measured in this view. Given that animals differed in size during the study, all dimensions were indexed for body weight. LV mass was calculated and corrected for small animals using the formula suggested by Reffelmann et al.<sup>1</sup> The Teicholz method was employed to calculate LV volumes (LVV = (7/(2.4+D))\*D3, where D is LV diastolic and/or systolic dimension). LV ejection fraction (EF) was calculated using the formula packed in the Vivid 7 system ((LVVd-LVVs)/LVVd\*100).

Pulsed-wave Doppler (PW) was used to record trans-mitral, trans-tricuspid, and pulmonary venous flow (TMF, TTF, PVF) in apical 4-chamber view. Peak velocity in early filling E and E wave deceleration time (E DT) were measured in TMF and TTF, and peak velocity in systolic S wave and diastolic D wave were measured in PVF. Mitral lateral, septal, and tricuspid lateral annulus moving velocity during early filling Em were derived by tissue Doppler imaging (TDI) in apical 4-chamber view. Tricuspid annulus plane systolic excursion (TAPSE) was measured by M-mode echocardiography, and RV lateral wall systolic moving velocity Sm was obtained by TDI in apical 4-chamber view. Continuous-wave (CW) Doppler at the conjunction of LV inflow and outflow was recorded in apical 5-chamber view, LV isovolumic relaxation time (IVRT) was

measured, and corrected (IVRTc) by R-R intervals taken from simultaneously recorded ECGs.<sup>2</sup> The average of 3 consecutive cardiac cycles was used for each measurement, with the operator being blinded to treatment assignment. Special care was taken to get similar imaging at follow up study.

### In vivo electrophysiological study

At 16 weeks, a subgroup of rats from Ex and Sed groups underwent in vivo electrophysiological study (EPS). The procedure was performed under general anesthesia with 2% isoflurane. After analgesia with buprenorphine (0.03-0.05 mg/Kg), a 1.9F octapolar electrocatheter (Scisense FTS-1913A-1018, London (ON), Canada) was introduced into the right ventricle through the right jugular vein. Surface ECG (lead I) and intracardiac electrograms were recorded on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, Paris, France) for monitoring and later analysis and measurement. Programmed right-ventricular stimulation was performed at a cycle length of 150 ms to determine the ventricular effective refractory period (VERP). QRS duration and the duration of the ventricular intracavitary electrogram were measured as indices of ventricular conduction. For assessment of inducibility of ventricular arrhythmias, double and triple extrastimulation techniques were administered to a minimal coupling interval of 30 ms, during spontaneous sinus rhythm and following a 9-beat train at a cycle length of 150 ms. Right-ventricular burst pacing at rates of 80 to 60 ms cycle length was also performed if no sustained arrhythmias were induced with 2-3 extrastimuli. Sustained ventricular tachycardia (VT) was defined as episode of ventricular arrhythmia lasting  $\geq$  10 s induced by ventricular stimulation.

## Histology and morphometry

Total cardiac mass was assessed by heart-weight-to-body-weight ratio. Individual-chamber mass was assessed by chamber-weight-to-body-weight ratios. Relative LV to RV hypertrophy

was evaluated according to the formula proposed by Fulton (LV free-wall (FW) weight+interventricular-septum (IVS) weight/RV weight).<sup>3</sup>

For histological studies, the hearts were perfused with a fixative solution (10% neutral-buffered formalin) at a pressure of 80 cm  $H_2O$ , immersed in the fixative for 12 - 24 h, and embedded in paraffin. Ventricular hypertrophy was evaluated morphometrically by direct measurement of ventricular wall thickness in all the heart sections (analySIS Image Processing software, Soft Imaging System, Germany) at RV FW, IVS and LV FW levels. Differences in ventricular-size were controlled by indexing wall-thickness to body-weight.

Heart sections were stained with Masson's trichrome to identify connective tissue and collagen deposition. Additionally, sections from the RV and LV were stained with picrosirius-red for quantification of collagen deposition using analySIS Image Processing software (Soft Imaging System GMBH, Germany), as previously described.<sup>4</sup> Perivascular collagen was excluded from this measurement.

# Hydroxyproline content

Ventricular hydroxyproline content was measured using the method described by Woessner.<sup>5</sup> Samples of RV and LV were homogenized and then hydrolyzed in 6M HCl for 18 h at 110°C. The hydrolysate was then neutralized with 2.5M NaOH and analyzed for hydroxyproline content after addition of chloramine T, perchloric acid and dimethylaminobenzaldehyde. Samples were read for absorbance at 550 nm in a spectrophotometer. Results are expressed as µg of hydroxyproline per mg dried tissue sample.

### <u>mRNA analysis</u>

Total RNA was extracted from 50 to 100 mg of a section of the right atrium (RA), left atrium (LA), RV and LV using Trizol® reagent (Invitrogen Corporation, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA integrity and loading amounts were assessed by examining

4

UV/VIS at a multiple wave lengths following the ND-3300 user manual V2.5, instructions (ND-3300, NanoDrop Technologies, USA). Analysis of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Fibronectin-1, metalloproteinase 2 (MMP2), tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1), procollagen-1 (Proc-I) and procolagen-3 (Proc-III) mRNA expression was obtained by Real-Time PCR. One µg total mRNA was converted to cDNA with the iScript cDNA (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. 100 ng of cDNA was amplified by the iCycler IQ<sup>TM</sup> version 3.1 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) using Applied Biosystems (Applied Biosystems, CA, USA) TaqMan gene expression assays (Rn00572010m1 for TGF- $\beta$ 1, Rn00569575-m1 for fibronectin, Rn02532334-s1 for MMP2, Rn00587558-m1 for TIMP1, Rn01526721-m1 for Proc-I, Rn01437675-m1 for Proc-III and Rn00667869-m1 for Actin, which was used as a housekeeping reference). Data were analyzed with the  $\Delta$ Ct method as previously described.<sup>6</sup>

# SDS-PAGE and Western blot

Protein samples were extracted using Nonidet P-40 buffer. SDS-PAGE was performed on 5%-13% acrylamide gels. Proteins were electrotransferred to nitrocellulose membrane and probed with primary antibodies. The antibodies used included mouse monoclonal anti-TGF-β1 (ab27969, dilution1/2000), mouse monoclonal anti-MMP2 (ab7032 dilution 1/1000), rabbit polyclonal to TIMP1 (ab61224 dilution 1/1000), mouse monoclonal to collagen-I (ab6308 dilution 1/1000) (all of them acquired from Abcam plc, Cambridge, UK); rabbit polyclonal antifibronectin ( BP8025, dilution 1/1000) (Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) and rabbit polyclonal to collagen-III (dilution 1/500) (Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA), and mouse monoclonal anti-actin (dilution (1/1000) (Chemicon-Millipore Co, MA, USA), which served as a housekeeping reference. The membranes were incubated with the corresponding peroxidaseconjugated secondary antibodies, washed, and then incubated with ECL reagents (GE Healthcare Europe GmbH; Freigburg; GE) before exposure to high performance chemiluminescence films. Gels were calibrated using Bio-Rad standard proteins (Hercules, CA) with markers covering a 7-240 kDa range.

Films were scanned by using image-editing software NIH ImageJ software for densitometric analysis of immunoreactive bands.

### Statistical analysis

Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was generally carried out with two-way ANOVA, with the exceptions described in detail below. In the case of a significant interaction by 2-way ANOVA or a significant difference on 1-way ANOVA, Bonferroni-corrected t-tests were used to assess Sed versus Ex group-differences, except as otherwise indicated. All P-values shown were obtained by multiplying the P value for the non-paired t-test by the correction factors indicated below. In the absence of interaction, P-values are shown for significant main-effect differences. Ex versus Sed immunoblots and electrophysiological-testing results were compared with t-tests for non-paired samples. Fisher's exact test was used to compare frequency-variables.

Detailed specifications of statistical analysis in each figure:

<u>Figure 1A:</u> An analysis of variance model, including exercise group (sedentary, exercise), time-point (4 weeks, 8 weeks and 16 weeks) and the interaction term (exercise x time-point) was performed. Each heart weight was obtained on a separate heart so there are no repeated measures. The interaction was not significant, so the overall group effect is presented. Exercise group effect was significant and is depicted in the figure.

<u>Figure 1C:</u> A repeated measure analysis model, including exercise group (sedentary, exercise), repeating factor ventricular wall (as results were obtained for right ventricular free wall, interventricular septum and left ventricular free wall in each heart) and the interaction term (exercise x ventricular wall) was performed at each time point (4 weeks, 8 weeks and 16 weeks). At 4 weeks, neither the interaction term nor the exercise group effect were significant.

At 8 and 16 weeks, interaction term was significant at the 0.05 level, so comparisons between exercise groups within each ventricular wall were done. The Bonferroni-corrected t-test (correction factor 3) was used to control for the family-wise error rate by reporting the adjusted p-value for every comparison.

<u>Figure 2B:</u> A repeated measure analysis model, including exercise group (sedentary, exercise), repeating factor ventricular wall (since results were obtained for right ventricular free wall, interventricular septum and left ventricular free wall in each heart) and the interaction term (exercise x ventricular wall) was performed at each time-point. At 4 and 8 weeks, neither the interaction term nor the exercise-group effect were significant. At 16 weeks, the interaction term was significant at the 0.01 level, so comparisons between exercise groups (sedentary vs exercise) within each ventricular wall were done. The Bonferroni-corrected t-test (correction factor 3) was used to control for the family-wise error rate by reporting the adjusted p-value for every comparison

<u>Figure 3B</u> A two-way analysis of variance model, including exercise group (sedentary, exercise), time-point (4 weeks, 8 weeks or 16 weeks) and the interaction term (exercise x ventricular wall) was performed. Each measurement was from a separate heart so there were no repeated measures. The interaction term was significant at the 0.01 level, so comparisons between exercise groups (sedentary vs exercise) within each time-point were done. The Bonferroni-adjusted t-test (correction factor 3) was used to control for the family-wise error rate by reporting the adjusted p-value for every comparison

<u>Figure 4:</u> A repeated measure analysis of variance model, including exercise group (sedentary, exercise), repeating factor cardiac chamber (right atrium, left atrium, right ventricle and left ventricle) and the interaction term (exercise x cardiac chamber) was performed for each individual fibrosis marker. The interaction term was significant for all the fibrosis markers at the 0.05 level, so comparisons between exercise groups (sedentary, exercise) within each cardiac chamber were done (four comparisons per chamber). The Bonferroni-corrected t-test

(correction factor 4) was used to control for the family-wise error rate by reporting the adjusted p-value for every comparison

<u>Figure 5:</u> In Figure 5, all Western blots for all Sed and Ex samples for one region were obtained on a single gel to ensure comparability. Because technical factors can greatly affect results between gels, the results for one region (which were done on one gel) cannot be compared in a valid way to results from another region (which because of limits on the number of samples that can be loaded on each gel had to be performed on a separate gel). Therefore, there were no repeated measures in Figure 5 and Sed vs Ex were compared by nonpaired t-test within each region.

Figure 6: The proportions of inducibility of ventricular arrhythmias were compared with the Fisher exact test.

<u>Figure 7A:</u> An analysis of variance model, including exercise group (sedentary, exercise), deconditioning-time (exercise, deconditioning 2 weeks, deconditioning 4 weeks and deconditioning 8 weeks) and the interaction term (exercise x deconditioning-time) was performed. Each heart weight was obtained on a separate heart so there are no repeated measures. The interaction was significant at the 0.05 level. Consequently, comparisons between exercise groups (exercise vs sedentary) within each deconditioning-times (Ex vs DEx2, Ex vs DEx4 and EX vs DEx8, 3 comparisons) were done. The Bonferroni-adjusted t-test (correction factor 7) was used to control for the family-wise error rate by reporting the adjusted p-value for every comparison.

<u>Figure 7B:</u> A repeated measures analysis of variance model, including exercise-deconditioning group (sedentary, exercise, deconditioning 2 weeks, deconditioning 4 weeks and deconditioning 8 weeks), repeating factor ventricular wall (since results were obtained for right ventricular free wall, interventricular septum and left ventricular free wall in each heart) and the interaction term (exercise-deconditioning x ventricular wall) was performed. The interaction was significant at the 0.01 level, so comparisons between exercise groups (Sed vs Ex, DEx2,

DEx4 and DEx8, and Ex vs DEx2, DEx4 and DEx8, accounting for 7 comparisons) within each ventricular wall (3 ventricular walls) were done. The Bonferroni-corrected t-test (correction factor 21) was used to control for the family-wise error rate by reporting the adjusted p-value for every comparison.

<u>Figure 7E and 7F</u>: For these data sets, results for only one sedentary group (corresponding to 16-week exercise) were available. One-way ANOVA was therefore applied. The main-effect factor was group and was a statistically-significant determinant of the dependent variable. Pairwise comparisons (Bonferroni-corrected t-tests) were performed between Sed and each Ex or DEx group (4 comparisons) and between Ex and each DEx group (3 comparisons); thus, a Bonferroni correction factor of 7 was used.

Figure 8: A repeated measures analaysis of variance model, including exercise-deconditioning group (sedentary, exercise, deconditioning 2 weeks, deconditioning 4 weeks, deconditioning 8 weeks), repeating factor cardiac chamber (right atrium, left atrium, right ventricle, left ventricle) and the interaction term (exercise/deconditioning x cardiac chamber) were performed for each fibrosis marker (each panel). The interaction term was not significant for any of the fibrosis markers, so only the overall group effect is presented. Exercise/deconditioning group effect was significant for all fibrosis markers at the level of 0.001, so comparisons among exercise/deconditioning groups were obtained (Sed vs Ex, DEx2, DEx4 and DEx8 to look for differences in comparison to baseline, and Ex vs DEx2, DEx4 and DEx8 to establish the DEx groups with significant recovery, accounting for a total of 7 comparisons per fibrosis marker). The Bonferroni-corrected t-test (correction factor 7) was used to control for the family-wise error rate by reporting the adjusted p-value for every comparison.

Table 1: Comparisons by non-paired t-test between Ex and Sed.

<u>Table 2:</u> A repeated measures analysis of variance, including exercise group (sedentary, exercise), repeating factor time-point (each rat has echocardiographic data at baseline, 8 and 16 weeks) and the interaction term (exercise x time-point) was performed. Interaction was significant at the 0.05 level for LVDd/BW, LVDs/BW, IVS/BW, PW/BW, LV mass/BW, EF, S

wave PV, IVRTc, E DT, and LADs/BW. For these, comparisons between groups (Ex, Sed) were performed at each time-point (baseline, 4 weeks, 8 weeks). The Bonferroni-corrected t-test was used to control the family-wise error rate (correction factor 3). Interaction was not significant but there was a significant group effect (Ex vs Sed) for IVS/LVDd and E veloc.

Table 3: Comparisons by non-paired t-test between Ex and Sed.

<u>Online Table 1:</u> A repeated measure analysis of variance model, including exercise group (sedentary, exercise), cardiac chamber (right atrium, left atrium, right ventricle and left ventricle) and the interaction term (exercise x cardiac chamber) was performed for each separate fibrosis markers. Neither interaction term nor exercise group effect were found to be significant in any of the fibrosis markers.

<u>Online Figure 1</u>: An analysis of variance model, including exercise group (sedentary, exercise), time-point and the interaction term (exercise x ventricular wall) was performed. Neither interaction term nor exercise group effects were found to be significant for any of the time-points.

# SUPPLEMENTARY REFERENCES

### Reference List

- (1) Reffelmann T, Kloner RA. Transthoracic echocardiography in rats. Evalution of commonly used indices of left ventricular dimensions, contractile performance, and hypertrophy in a genetic model of hypertrophic heart failure (SHHF-Mcc-facp-Rats) in comparison with Wistar rats during aging. *Basic Res Cardiol*. 2003;98:275-84.
- (2) Shi Y, Denault AY, Couture P, Butnaru A, Carrier M, Tardif JC. Biventricular diastolic filling patterns after coronary artery bypass graft surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;131:1080-6.
- (3) Fulton RM, Hutchinson EC, Jones AM. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J.* 1952;14:413-20.
- (4) Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11:447-55.
- (5) Woessner JFJ. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*. 1961;93:440-7.
- (6) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.

# SUPPLEMENTARY TABLES

Table 1. mRNA expression of TGF-β1, fibronectin-1, MMP2, TIMP1, procollagen-I, procollagen-III in the four cardiac chambers at 4 and 8 weeks in Sed and Ex groups. Results are normalized to actin mRNA expression. Values are mean ± SEM of 4 animals (Sed at 4 and 8 weeks) and 5 animals (Ex at 4 and 8 weeks). There were no statistically-significant differences. Statistical analysis was by 2-way ANOVA.

				Right	atrium					Left a	Itrium				œ	light v	entric	e				Left ve	ntricle		
		Sec	deni	tary	Щ	erci	se	Set	dent	ary	ш	rerci	se	Sec	dent	ary	ш	xerc	ise	Se	dent	ary	Ŵ	rerci	se
		<u> </u>	(n=4	-	~	(n=5)	_	-	,n=4		-	(n=5		<u> </u>	(n=4)			⊆=u)			(n=4)		-	(n=5	
	<b>TGFβ</b> Relative expression	1.00	+1	0.40	0.71	+1	0.27	1.00	+1	0.50	1.99	+1	0.48	1.00	+1	0.32	1.04	+1	0.20	1.00	+1	0.38	0.41	+1	0.41
	Fibronectin Relative expression	1.00	+1	0.35	0.97	+1	0.37	1.00	+1	0.31	1.42	+1	0.34	1.00	+1	0.62	0.96	+1	0.45	1.00	+1	0.32	0.62	+I	0.21
-	MMP2 Relative expression	1.00	+1	0.42	1.06	+1	0.50	1.00	+1	0.30	2.01	+1	0.77	1.00	+1	0.71	2.28	+1	0.77	1.00	+1	0.47	0.38	+1	0.07
4 weeks	TIMP1 Relative expression	1.00	+1	0.67	0.54	+1	0.32	1.00	+1	0.43	1.74	+1	0.42	1.00	+1	0.46	1.07	+1	0.05	1.00	+1	0.48	0.39	+1	0.20
	Proc-I Relative expression	1.00	+1	0.76	0.77	+1	0.76	1.00	+1	0.56	2.26	+1	0.11	1.00	+1	0.68	1.33	+1	0.69	1.00	+1	0.66	1.16	+1	0.83
	Proc-III Relative expression	1.00	+1	1.04	0.95	+1	1.04	1.00	+1	0.29	1.62	+1	0.39	1.00	+1	0.61	0.90	+1	0.30	1.00	+1	0.53	1.03	+1	0.53
	<b>TGFβ</b> Relative expression	1.00	+1	0.34	1.44	+1	0.62	1.00	+1	0.56	3.76	+1	1.09	1.00	+1	0.56	1.91	+1	0.73	1.00	+1	0.47	2.19	+1	0.43
	Fibronectin Relative expression	1.00	+1	1.04	2.57	+1	2.83	1.00	+I	0.39	6.29	+1	2.26	1.00	+1	0.56	5.01	+1	2.62	1.00	+1	0.19	1.89	+1	0.32
-	MMP2 Relative expression	1.00	+1	0.56	1.84	+1	0.83	1.00	+1	0.15	3.42	+1	0.99	1.00	+1	0.51	1.52	+1	0.58	1.00	+1	0.64	0.93	+1	0.36
8 weeks	TIMP1 Relative expression	1.00	+1	0.12	1.63	+1	0.77	1.00	+1	0.10	3.97	+1	1.34	1.00	+1	0.43	4.51	+1	1.52	1.00	+1	0.34	3.09	+1	1.32
	Proc-I Relative expression	1.00	+I	0.38	3.48	+1	1.33	1.00	+1	0.34	0.98	+1	0.62	1.00	+1	0.43	2.53	+1	0.37	1.00	+1	0.34	1.25	+I	0.24
	Proc-III Relative expression	1.00	+1	0.43	2.55	+1	0.62	1.00	+1	0.38	2.14	+1	1.10	1.00	+1	0.34	1.95	+1	0.29	1.00	+1	0.64	1.34	+1	0.63



# SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

**Supplementary Figure 1:** (A) Representative picrosirius-red stained photomicrographs of left ventricular sections obtained from the interventricular septum and the left ventricular free wall. (B) Mean±SEM hydroxyproline-content in left ventricle (whole tissue). n=4 (Sed, 4 and 8 weeks), n=6 (Sed, 16 weeks), n=5 (Ex, 4 and 8 weeks) and n=8 (Ex 16 weeks). Two-way ANOVA (exercise and timepoint as main factors).