



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



“Efecto del entrenamiento de nado en el manejo del calcio intracelular en
cardiomiocitos de ratas”

Rodrigo Juan Manuel Ceballos Ceballos

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN FISIOPATOLOGÍA**

Director de Tesis: Dr. Diego Varela Lekanda

Índice

Índice	2
Abreviaturas	4
Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
1.1 Hipertrofia cardiaca patológica y fisiológica	7
1.2 Tensión y sensibilidad a Ca²⁺	12
1.3 Acoplamiento excitación-contracción	13
1.4 Mecanismos que modulan la contracción muscular cardíaca	15
1.5 Ejercicio físico y mecanismos de regulación del calcio	16
II. Hipótesis	18
III. Objetivo General	18
IV. Objetivos específicos	18
V. Materiales y métodos	19
5.1 Aprobación ética y modelo animal	19
5.2 Protocolo de entrenamiento de nado	19
5.3 Aislación de cardiomiocitos	20
5.4 Medición de calcio intracelular	21
5.5 RT-PCR	22
5.6 PCR semi-cuantitativa	23
5.7 Mediciones bioquímicas: Ensayo Inmunoblot (Western Blot)	24
VI. Análisis estadístico	26
VII. Resultados	27
7.1 Peso corporal y peso cardíaco	27
7.2 Parámetros Ecocardiográficos	28
7.3 Histología	31

7.4 Imágenes de calcio	33
7.5 Expresión génica	36
7.6 Expresión proteica	38
VIII. Discusión	43
Adaptaciones ecocardiográficas	43
Modificaciones del acoplamiento excitación-contracción-relajación	46
IX. Conclusiones	52
X. Referencias	53

Abreviaturas

DVI = Diámetro del ventrículo izquierdo

PPVI = Pared posterior del ventrículo izquierdo

MVI = Masa ventricular izquierda

VS = Volumen sistólico

VDF = Volumen diastólico final del ventrículo izquierdo

VI = Ventrículo izquierdo

E = Llenado temprano del ventrículo izquierdo

PI3K = Fosfatidilinositol 3 Quinasa

AKT = Proteína Quinasa B

mTOR = Diana de rapamicina en mamíferos

CICR = Liberación de calcio inducida por calcio

RYR = Receptor de rianodina

LTCC = Canal de calcio tipo L

SERCA = Calcio ATPasa del retículo sarcoplásmico

RS = Retículo sarcoplásmico

NCX = Intercambiador Sodio/Calcio

DTs = Diámetro telesistólico

DTd = Diámetro telediastólico

FC = Frecuencia cardíaca

FAS = Fracción de acortamiento sistólico

Resumen

El entrenamiento físico es definido como un adiestramiento que conlleva a una mejora del rendimiento físico y, de esta forma, genera adaptaciones en gran parte de los tejidos del organismo, siendo la hipertrofia cardíaca fisiológica uno de las más notables. Este tipo de proceso ocurre en deportistas sometidos a grandes volúmenes de entrenamiento y genera modificaciones tanto estructurales como funcionales. Entre ellas, la mejora en la contractilidad cardíaca es uno de los parámetros más estudiados y que mayor relevancia tiene en sujetos deportistas. En sujetos normales, la contractilidad del corazón está íntimamente regulada por el manejo del calcio intracelular y por su unión al complejo de las troponinas, por lo que es esperable que un gran volumen de entrenamiento genere una alteración en los sistemas regulatorios del calcio para mejorar la eficiencia de este órgano. Según los resultados obtenidos en este estudio, mediante ecocardiografía e histología, se pudo comprobar que el corazón de ratas entrenadas presentaba adaptaciones funcionales y estructurales que mejoran la función de la bomba. Además, existe un aumento en la expresión proteica del $Ca_v1.2$, NCX, SERCA y PLB fosforilado en treonina, además de un aumento en la extrusión Ca^{2+} mediante NCX, junto con una disminución de liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico al compararlo con la liberación estimulada por cafeína. Es por esto que los cambios observados a nivel molecular podrían reflejar un estado de máxima eficiencia, que es totalmente opuesta a un proceso patológico, el cual lleva a la células cardíacas a disfunción y apoptosis. El análisis de todos estos parámetros nos proporcionó algunas claves para entender el efecto del ejercicio en la homeostasis del Ca^{2+} en cardiomiocitos de ratas.

Abstract

The chronic physical exercise is defined as a training that leads to an improvement of the physical performance and, in this way, it generates adaptations in a large part of the tissues of the organism, being the physiological cardiac hypertrophy one of the most remarkable. This process occurs in athletes subjected to large volumes of training and generates both structural and functional modifications. Among them, the improvement in cardiac contractility is one of the most studied parameters and that has greater relevance in sports subjects. In normal subjects, the contractility of the heart is closely regulated by intracellular calcium handling and by its binding to the troponin complex, so it is expected that a large volume of training will generate an alteration in the calcium regulatory systems to improve the efficiency of the body. According to the results obtained in this study, using echocardiography and histology, it was found that the heart of trained rats presented functional and structural adaptations that improve the pump function. Also, there is an increase in protein expression of $Ca_v1.2$, NCX, SERCA and phosphorylated PLB in threonine, in addition to an increase in Ca^{2+} extrusion by NCX, together with a decrease in Ca^{2+} release from the reticulum sarcoplasmic when compared to the release stimulated by caffeine. This is why the changes observed at the molecular level could reflect a state of maximum efficiency, which is totally opposite to a pathological process, which leads the heart cells to dysfunction and apoptosis. The analysis of all these parameters gave us some clues to understand the effect of exercise on Ca^{2+} homeostasis in rat cardiomyocytes.

I. Introducción

1.1 Hipertrofia cardiaca patológica y fisiológica

El proceso de hipertrofia comienza como producto de una respuesta compensatoria que intenta optimizar el estrés biomecánico necesario para normalizar la función de la bomba cardíaca. Este evento puede tener lugar tanto gracias a factores extrínsecos, como hipertensión arterial, valvulopatías, infarto al miocardio y ejercicio físico, como a factores intrínsecos, por ejemplo, la cardiomiopatía hipertrófica familiar (1). Esta idea del cambio morfológico fue posteriormente reforzada con estudios de funcionalidad cardíaca, y se determinó que el corazón puede presentar, ante distintos estímulos, tanto una hipertrofia patológica como fisiológica, y puede afectar desde una cámara hasta el corazón completo y, a su vez, puede eventualmente inducir a una cardiomiopatía dilatada, a arritmia, fibrosis, insuficiencia cardíaca, y/o a una enfermedad coronaria (2).

El proceso patológico de crecimiento cardíaco puede ocurrir de al menos dos formas: la primera es llamada hipertrofia concéntrica, la cual es producida por una sobrecarga de presión la que conlleva a un aumento en el ancho de los cardiomiocitos por sobre el aumento en su largo. La segunda es denominada hipertrofia excéntrica y es producto de una sobrecarga de volumen, en la cual el incremento en el largo de los cardiomiocitos es mayor que en su ancho (3). Este proceso de crecimiento, ya sea por hipertrofia concéntrica o excéntrica, en última instancia, lleva a una activación de genes de expresión rápida (c-jun, c-fos, c-myc) y de genes fetales como ANP y la cadena pesada de β -miosina (β -MHC), los cuales son considerados marcadores de hipertrofia patológica (4).

Existen una gran cantidad de factores extracelulares y vías de señalización que intervienen en el desarrollo de la hipertrofia patológica y fisiológica. El primero de estos es iniciado por estímulos neuro-hormonales tales como angiotensina-2, endotelina 1 y adrenalina, los cuales inducen un aumento del gasto cardíaco y mejoran la función de la bomba (5). La vía central en el desarrollo de hipertrofia

patológica es la iniciada con agonistas adrenérgicos, los cuales mediante receptores acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés), producen la activación de la proteína Gq activando a la fosfolipasa C (PLC) que a su vez hidroliza a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2, por sus siglas en inglés). Esto va a generar 2 productos: inositol 1,4,5 trifosfato (IP3, por sus siglas en inglés), el cual va a aumentar el Ca^{2+} intracelular debido a la movilización desde organelos intracelulares, y diacilglicerol (DAG) el cual activa a la proteína quinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) y que es un importante factor para la generación de hipertrofia cardíaca concéntrica (6). La vía calcineurina-NFAT es una de las vías más estudiadas de desarrollo de hipertrofia maladaptativa (patológica); calcineurina, es una fosfatasa dependiente de calmodulina, que desfosforila a NFAT permitiendo la translocación de este último al núcleo (7), siendo este proceso comandado únicamente por elevaciones sustanciales del calcio intracelular (8), producidos por ejemplo por el aumento de IP3 ante una estimulación adrenérgica sostenida.

Por otro lado, al hablar de hipertrofia cardíaca fisiológica, Giovanni Lancisi (1654 - 1720), el cual es llamado el padre de la cardiología, y a Jean Nicolas Corvirsart (1755 - 1821), fueron los primeros quienes atribuyeron el crecimiento cardíaco al entrenamiento físico (9, 10). Luego, con la evidencia obtenida en los siglos posteriores mediante fonocardiografía, electrocardiografía y ecocardiografía, comenzó a asociarse, ya a partir de los primeros estudios de Morganroth (11), el término “corazón de atleta” a aquellos corazones que presentaban una hipertrofia excéntrica del ventrículo izquierdo (VI), la cual estaba reflejada en un aumento en la dimensión y en la masa de esta cavidad, con cambios menores en el grosor de la pared.

Los mecanismos que explican el desarrollo de la hipertrofia cardíaca fisiológica difieren, en gran medida, de aquellos involucrados en procesos patológicos, como ha sido demostrado en los estudios de McMullen y cols., en donde es sugerido que la proteína fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) juega un rol importante en la inducción de la hipertrofia cardíaca fisiológica pero no de la

patológica (12). En este sentido, ha sido demostrado que la práctica de ejercicio físico regular produce un aumento agudo del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), siendo estas respuestas influenciadas por la intensidad del ejercicio (13); de esta forma, se postula la existencia de una vía de señalización implicada en la hipertrofia cardíaca fisiológica, la cual incluiría la vía de la proteína quinasa B (AKT) y la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR por sus siglas en inglés) siendo esta vía activada por el ejercicio, tanto de intensidad moderada como de alta intensidad. Así, la vía sugerida que promueve la adaptación cardíaca comienza con la activación del receptor de IGF, el cual una vez activo induce la activación de PI3K/AKT y posteriormente mTOR, aumentando la actividad ribosomal y la tasa de síntesis proteica, mediante la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (14).

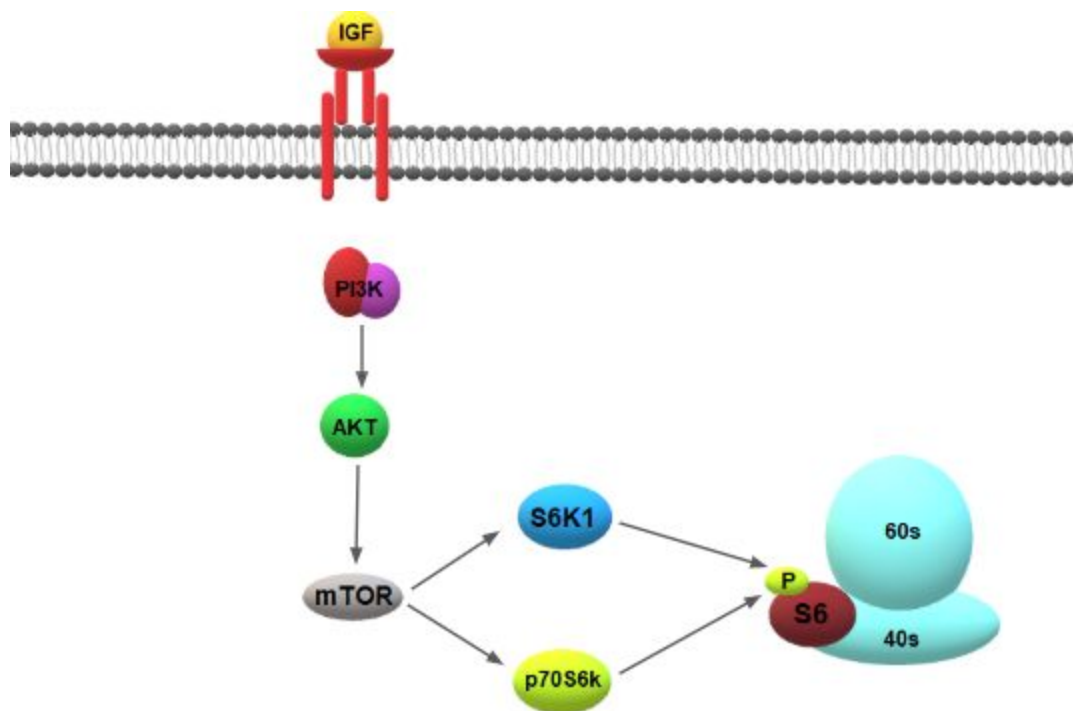


Figura 1. Vía de señalización involucrada en la hipertrofia cardíaca fisiológica. El aumento agudo del factor de crecimiento similar a la insulina produce una activación, vía receptor de tirosina quinasa, de la proteína fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3k), la cual a su vez fosforila a la proteína quinasa B (AKT), liberando a mTOR de su complejo inhibitorio,

permitiendo la fosforilación S6K1 y de p70S6K, los cuales a su vez fosforilan a la proteína ribosomal S6 produciendo un aumento en la síntesis proteica.

Además, ha sido determinado que el ejercicio físico promueve la producción de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés), tanto en el endotelio vascular del músculo esquelético (15), como en el músculo cardíaco (16); NO estimula la formación de cGMP, (17) y éste actúa, fundamentalmente, sobre la proteína quinasa 1 (PKG-1), la que a su vez reduce la translocación de NFAT hacia el núcleo, inhibiendo así la hipertrofia patológica. Cabe destacar que las adaptaciones producidas por el ejercicio están basadas en la intermitencia de éste, es decir, en el lapso de tiempo que transcurre entre la fatiga inducida por el entrenamiento, y su posterior recuperación, lo que permite que existan incrementos temporales de proteínas involucradas en la señalización de la hipertrofia fisiológica, como Akt e IGF (patrón de expresión “pulsátil”). La importancia de estos cambios temporales de expresión fue evidenciada en un estudio, en donde la sobreexpresión constitutiva de AKT produjo, a lo largo del tiempo, una disfunción cardíaca, demostrando que el factor causal de la hipertrofia fisiológica no es el aumento en la expresión de esta proteína, sino su cambio en el tiempo (18).

Desde la década de 1960, diferentes modelos de entrenamiento han sido desarrollados en mamíferos cuadrúpedos, en los que, dependiendo del modelo de entrenamiento utilizado, el tipo de adaptación cardíaca difiere. Es así como Van Liere y Cols., en el año 1957, determinaron que, en ratas sometidas a un entrenamiento periódico por 2 horas diarias, era producida una hipertrofia cardíaca al comparar estos animales con ratas no entrenadas (19). Estas adaptaciones fueron reafirmadas por posteriores estudios (20, 21, 22), en los que fue evaluado principalmente el peso de corazón. Al hablar de resultados ecocardiográficos, mediante un entrenamiento de nado de gran volumen, el estudio de Radovits y cols. demostró un aumento en el grosor de la pared, así como también, en el índice de masa total del VI en ratas entrenadas al compararlas con las controles (23). Estas adaptaciones en humanos están descritas ampliamente en la literatura científica

actual, pero tienen su origen en los trabajos de DeMaria y Cols. en el año 1978, en donde, mediante ecocardiografía fue determinado que los sujetos sometidos a entrenamiento físico periódico desarrollaban un aumento en el diámetro telediastólico (DTd), el que corresponde al diámetro ventricular máximo en diástole. Además encontraron un engrosamiento en la pared posterior del ventrículo izquierdo (PPVI) así como un aumento de la masa ventricular izquierda estimada (MVI) (24). Estos hallazgos fueron corroborados posteriormente y revisados por Peronnet y Cols. quienes concluyeron además que (a) atletas de élite presentan un tamaño aumentado en el DVI, (b) el grosor de la pared ventricular es mayor en los atletas involucrados en deportes de ejercicio estático y (c) los atletas involucrados en ejercicios de resistencia cardiorrespiratoria presentan un aumento en el DVI (25).

Estos cambios adaptativos documentados, tanto en animales como en humanos, incluyen una bradicardia de reposo y submaximal (26, 27), un aumento del volumen atrial izquierdo, un aumento del grosor del VI y ventrículo derecho (VD), un aumento en los diámetros diastólicos izquierdo y derecho, y una mejora en el volumen sistólico de los VD y VI (28). Generalmente es dado por entendido, mediante la Ley de Frank-Starling (29), que el aumento del volumen sistólico (VS) en sujetos entrenados está asociado, casi siempre, con un aumento en el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (VDFVI). En este estado de entrenamiento, el aumento del VDFVI puede ser adquirido mediante diversos mecanismos, los que incluyen el aumento de la distensibilidad del miocardio, el aumento en la presión final de la diástole, y un aumento en la dimensión del VI, secundaria a un crecimiento de las células cardíacas (30, 31). A estas adaptaciones referentes a la función diastólica de los deportista debe añadirse que éstos presentan un llenado temprano mejorado del VI, representado con un aumento en la velocidad de la onda E, la cual corresponde al llenado dependiente tanto del retorno venoso como de la distensión pasiva del ventrículo izquierdo, y con una casi ausencia de la onda A (32), la cual está relacionada con la contracción auricular. Esta función diastólica eficientemente mejorada en atletas de élite permite que el VI pueda relajarse, brevemente, durante

frecuencias cardíacas elevadas, preservando así el VS. Esta característica, evaluada mediante ecocardiografía, es crucial para diferenciar un remodelamiento cardíaco adaptativo de uno patológico (33).

1.2 Tensión y sensibilidad a Ca^{2+}

Numerosos estudios han determinado que el ejercicio físico, realizado de forma periódica, permite un incremento en la función contráctil del miocardio ventricular tanto en humanos como en modelos animales. Es así como Russel y cols., determinaron que, en las dinámicas de acortamiento en células aisladas de corazones de ratas entrenadas sometidas a un estímulo eléctrico, no sólo presentaban un tamaño celular mayor sino también una fuerza de acortamiento mejorada (34). Asociado a lo anterior, también ha sido observado que las curvas de tensión, en estiramiento activo de músculos papilares de ratas entrenadas, eran mayores presentando una máxima tensión a la distancia de acortamiento óptimo de más del 37%, al compararlas a las de los controles (35).

Además, es sabido que la tensión sensible a Ca^{2+} en músculo cardíaco es altamente dependiente de cambios en la longitud del sarcómero; mientras mayor sea ésta, la sensibilidad del aparato contráctil a la activación por Ca^{2+} estará incrementada (36). Esto podría denominarse como un mecanismo celular de la ley de Frank-Starling, la cual describe el aumento del volumen sistólico ante un aumento en el volumen diastólico final.

Otro hallazgo que es importante destacar al hablar de función sistólica, de contractilidad del miocardio y de sensibilidad a Ca^{2+} , es el estudio de Diffie del año 2004, en donde, además de corroborar los resultados obtenidos por Russel y Molé con respecto al aumento en la tensión celular y de músculos papilares, respectivamente, determinó que en cardiomiocitos de ratas entrenadas el cambio en la longitud del sarcómero tenía un efecto mucho mayor en la tensión máxima y en la tensión sensible a Ca^{2+} (37).

1.3 Acoplamiento excitación-contracción

Por otro lado, también ha sido descrito que el manejo del Ca^{2+} intracelular está involucrado en la mejora de la función cardíaca explicada anteriormente (38). A modo general, la contracción del corazón, correspondiente al movimiento de acortamiento de las células cardíacas durante la sístole, es inducida por un potencial de acción generado en las células del nódulo sino-atrial, el cual es propagado, gracias al sistema electro-conductor, a todas las células cardíacas (39). Este potencial de acción induce la apertura de los canales de calcio tipo L (LTCC, por sus siglas en inglés) en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática: la entrada de Ca^{2+} , producto de la activación de estos canales, da lugar a un primer aumento del Ca^{2+} intracelular, el cual es el punto de inicio del proceso de liberación de calcio inducida por calcio (CICR), en donde los receptores de rianodina (RYR) son activados por la unión al Ca^{2+} liberando este ion desde el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma; para que esto ocurra, es necesario que los RYR estén localizados en áreas estratégicas de la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) (contiguos a los LTCC en el túbulo T del sarcolema), facilitando así este proceso (40, 41, 42).

Esta combinación entre el ingreso de Ca^{2+} por los LTCC activos y el proceso de CICR produce un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo cual permite que éste se una a la troponina C de los miofilamentos produciendo un cambio conformacional en su estructura, y facilitando de esta forma la interacción actina-miosina así como, la creación de puentes cruzados (43, 44). Luego, para completar el ciclo, el relajamiento del cardiomiocito es mediado por la disminución de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma lo cual es producto, principalmente, de la actividad de la bomba Calcio-ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA2a); esta bomba está encargada de capturar la mayoría del Ca^{2+} intracelular hacia el RS, usando la energía proveniente de la hidrólisis del ATP para transportar 2 iones Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada (45). La actividad de la SERCA2a está

regulada por la proteína fosfolamban, la cual, en su forma desfosforilada, inhibe a la bomba, mientras que en su estado fosforilado permite un aumento en el ingreso de Ca^{2+} hacia el RS, produciendo una relajación más rápida del cardiomiocito (46). Otra proteína que contribuye a la disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular es el intercambiador sodio calcio ($\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, NCX1), el cual remueve Ca^{2+} , a través del sarcolema, usando el gradiente de Na^+ , translocando 1 ion Ca^{2+} por 3 iones Na^+ (47). Particularmente, al hablar de corazones de ratas, el 92% del Ca^{2+} presente en el citoplasma durante el transitorio es removido por la bomba SERCA2a, el 7% por el NCX1, mientras que el 1% restante es incorporado a la mitocondria, o removido por la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana (PMCA) (48). A modo de resumen, la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} y su transitorio son esquematizados en la figura 2.

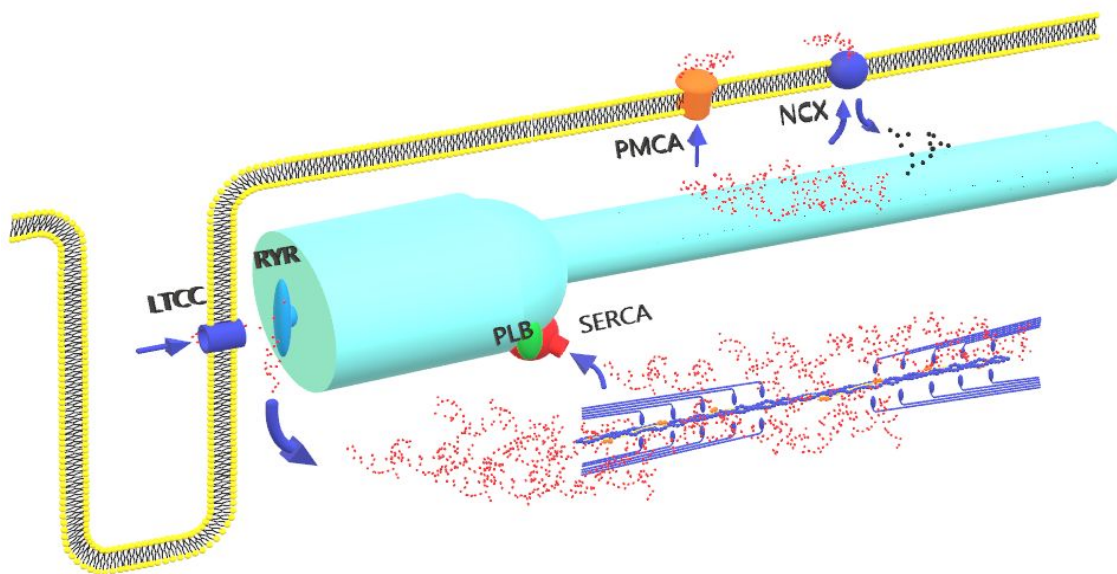


Figura 2. Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . Ante una despolarización de la membrana es inducida la apertura del LTCC generando una corriente de entrada de Ca^{2+} ; este ión difundirá y se unirá al RYR, produciendo la liberación masiva del Ca^{2+} almacenado desde el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma. El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular facilita su unión al complejo de las troponinas, produciendo así la contracción muscular. Los mecanismos de recaptura están comandados por la bomba SERCA y su proteína reguladora PLB, además de las proteínas de membrana sarcoplásmicas PMCA y NCX.

1.4 Mecanismos que modulan la contracción muscular cardíaca

Como fue descrito en la sección anterior, el Ca^{2+} es vital para que ocurra el acoplamiento actina-miosina, el cual tiene lugar en el filamento delgado, en donde troponina y tropomiosina actúan como una unidad reguladora manteniendo la relajación de la musculatura. En una contracción muscular, la relajación (o dicho de otra forma, la inhibición de la contracción) es eliminada transitoriamente mediante la unión del Ca^{2+} a la troponina C, gracias al aumento en la concentración citoplasmática de este ion generada por el CICR (49). Sin embargo, existen otros mecanismos que regulan y mejoran la contracción muscular cardíaca. Dos vías principales han sido descritas como las encargadas de regular la fuerza de la contracción cardíaca, ya sea mejorando el manejo del Ca^{2+} , o alterando los mecanismos contráctiles del cardiomiocito (50).

En referencia a la primera de estas vías, como fue mencionado anteriormente, el fosfolamban es un inhibidor de la SERCA2a en su forma no fosforilada, pero en su estado fosforilado aumenta significativamente la recaptación de Ca^{2+} mediada por esta bomba. Esta fosforilación es mediada principalmente por la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico (PKA) y por CaMKII (51). Otro mecanismo de regulación del Ca^{2+} intracelular es la propia cantidad de Ca^{2+} al interior del RS; esto significa que mientras mayor sea la concentración del ión al interior de este organelo, mayor será la liberación de Ca^{2+} ante un estímulo único, mientras que, en caso contrario, si la concentración dentro del RS es baja, la CICR será insuficiente (52, 53). Del mismo modo, ha sido reportado que la sensibilidad a Ca^{2+} del RYR es directamente proporcional a la cantidad de Ca^{2+} del RS (54, 55), por tanto, a una mayor concentración del ion en el lumen del RS, más sensibles serán los RYRs al ingreso de Ca^{2+} a través de los LTCC. Estos receptores, además de ser modulados por el Ca^{2+} del RS, pueden ver incrementada su actividad gracias a la acción de las quinasas PKA (56) y CaMKII (57).

1.5 Ejercicio físico y mecanismos de regulación del calcio

Desde fines del siglo XX múltiples estudios han investigado los efectos del ejercicio sobre el manejo de Ca^{2+} ya que éstos podrían explicar las mejoras en la función miocárdica y en la eficiencia hemodinámica experimentada en el ejercicio. Es por esto que los estudios han estado enfocados en los efectos del entrenamiento, en la función y composición del sarcolema y del RS, particularmente en sus roles en la regulación dinámica del Ca^{2+} (58).

Varios modelos en los que ha sido estudiada la función de la SERCA2a y la relajación ventricular han sido incapaces de demostrar una mejora en la recaptación de Ca^{2+} (59, 60, 61, 62). La excepción ha sido el modelo de entrenamiento de ratas nadadoras, donde la recaptación aumentada de Ca^{2+} ha sido bien documentada (63, 64, 65). Así mismo ha sido demostrado que el ejercicio físico aumenta la expresión de la SERCA2a y que la mayor tasa de recaptación de Ca^{2+} , por esta vía, es de aproximadamente un 30% mayor posterior al entrenamiento (66). En relación a los RYRs, Hass y cols., demostraron que el entrenamiento de nado en ratas disminuye la cantidad de estos receptores (67). Por otra parte, en relación al LTCC, Saborido y Cols., no observaron diferencias significativas en la cantidad de canales al comparar ratas ejercitadas vs ratas controles; ellos explican este resultado como una consecuencia de que, en su protocolo de entrenamiento, el estrés cardíaco inducido no fue suficiente para producir cambios (68). Por su parte, Tibbits y cols., detectaron una mayor actividad del intercambiador NCX, sin un correlativo aumento en la cantidad de esta proteína (69). El cambio en estas proteínas, relacionadas intrínsecamente con el manejo del Ca^{2+} intracelular, podría explicar, la mejora en la capacidad contráctil del corazón, pero debido a la variabilidad de los protocolos de entrenamiento (volumen, intensidad y frecuencia), no existe evidencia sólida que demuestre cambios en la expresión del conjunto de ellas, en un corazón entrenado. A su vez, Laughlin y cols., tampoco observaron diferencias entre los transitorios de Ca^{2+} (en reposo y en actividad) entre las ratas controles y las entrenadas (70), pero

los índices de efectividad del entrenamiento utilizado no fueron específicos para obtener una adaptación cardíaca (cambio en peso corporal, frecuencia cardíaca de reposo y actividad de la enzima citrato sintasa).

Actualmente, los cambios y el cómo es producida está hipertrofia cardíaca fisiológica están bien documentados en la literatura (71, 72), pero el rol del Ca^{2+} , su manejo, y su influencia en la mejora de la función contráctil no han sido actualizados a lo largo de los años. Si bien la evidencia en torno a la función del Ca^{2+} en la mejora de la contracción cardíaca es poca y contradictoria, existen 2 hipótesis que apoyan su contribución. La primera es que el ejercicio prolonga el plateau (fase meseta) del potencial de acción ventricular, lo cual implica un aumento en la corriente de Ca^{2+} durante el potencial de acción (73). La segunda hipótesis es, como fue mencionado anteriormente, es que el ejercicio aumentaría la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} .

Considerando los distintos mecanismos aquí expuestos, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de este tipo de entrenamiento en el manejo de Ca^{2+} intracelular. Para ello fueron evaluadas, a nivel funcional y de expresión, las distintas proteínas involucradas en el manejo y modulación de este ión en la contracción muscular. El análisis de todos estos parámetros nos proporcionó algunas claves para entender el efecto del ejercicio en la homeostasis del Ca^{2+} en cardiomiocitos de ratas.

II. Hipótesis

El entrenamiento físico de intensidad submáxima genera una alteración en el manejo del calcio intracelular debido a variaciones de expresión y/o actividad de una o varias de sus proteínas reguladoras, en cardiomiocitos de ratas adultas.

III. Objetivo General

Determinar las diferencias en el manejo de calcio intracelular y los mecanismos que lo regulan, entre cardiomiocitos de ratas entrenadas y de ratas controles.

IV. Objetivos específicos

4.1 Cuantificar los marcadores de hipertrofia y funcionalidad cardiaca (mediante ecocardiografía, razón peso-corazón/largo-tibia e histología de corazón) de ratas sometidas a un entrenamiento de nado periódico y de controles.

4.2 Comparar el manejo de calcio intracelular en cardiomiocitos aislados desde corazones de ratas sometidas a un entrenamiento de nado periódico y de ratas controles.

4.3 Comparar los cambios, a nivel de ARNm, de las proteínas encargadas del manejo de calcio intracelular en corazones de ratas sometidas a un entrenamiento de nado periódico y de ratas controles.

4.4 Comparar la cantidad de las distintas proteínas encargadas del manejo de calcio intracelular en corazones de ratas sometidas a un entrenamiento de nado periódico y de ratas controles.

V. Materiales y métodos

5.1 Aprobación ética y modelo animal

Esta tesis fue realizada contando con la aprobación del comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y usando como modelo animal, ratas de la cepa Sprague Dawley, las cuales una vez proporcionadas por el bioterio de la Facultad, tuvieron un período de aclimatación de 10 días. En total fueron 12 ratas pertenecientes al grupo intervención, es decir, las que fueron entrenadas mediante nado submáximo progresivamente, durante 12 semanas, y otras 7 ratas que pertenecieron al grupo control.

5.2 Protocolo de entrenamiento de nado

El protocolo de entrenamiento de nado estuvo basado en el estudio de Radovits et al., del año 2013, el cual establece un modelo en ratas para producir hipertrofia cardíaca robusta. Brevemente, las ratas fueron entrenadas 5 días a la semana, por un período de 12 semanas, en donde el tiempo de la primera sesión fue de 15 minutos, y cada 2 sesiones fueron agregados 15 minutos más hasta un total de 200 minutos. Este protocolo, previamente probado en nuestro laboratorio, nos aseguró que la intensidad de nado fuera submáxima puesto que cada sesión fue terminada cuando las ratas aún no estaban fatigadas. El peso de cada una de ellas fue medido cada 4 semanas. Para el entrenamiento fue construido un aparato de nado el cual fue dividido en 4 compartimentos de 25x30 cm, con una profundidad de 50 cm cada uno, los que fueron llenados con agua de grifo a una temperatura controlada de 30-32°C. Una vez que las ratas finalizaban su entrenamiento, eran secadas y colocadas en sus jaulas, con agua y comida *ad libitum*.

Previo a la eutanasia de los animales, los parámetros hemodinámicos de las ratas (tanto control como entrenadas) fueron determinados por ecocardiografía gracias a una colaboración con el Dr. Juan Pedro Peña.

5.3 Aislación de cardiomiocitos

Los cultivos primarios de cardiomiocitos fueron generados a partir de corazones de rata adulta (controles y entrenadas), en base al uso de una metodología similar al método Langendorff. Esta metodología permite la digestión del corazón, previamente aislado, con una solución de perfusión enzimática conteniendo colagenasa tipo II y proteasa tipo XIV. Una vez retirado el corazón, previo a la extracción de los cardiomiocitos, éste fue pesado.

Para la extracción del corazón, la rata fue previamente anestesiada con una solución de ketamina + xilazina, por vía intraperitoneal. Por cada 100g de peso de rata fue utilizado un volumen de solución de anestesia de 120cc, con una razón entre ketamina y xilazina de 3:1. Posterior a la apertura de la cavidad abdominal, fue inyectada una dosis de heparina por la vena cava inferior, para luego proceder a extraer el corazón desde la cavidad torácica, depositándolo en una placa conteniendo solución B (buffer de fosfato salino, PBS) sobre una cama de hielo. Inmediatamente después, el corazón fue canulado a través de la arteria aorta y conectado a una bomba peristáltica para proceder a una perfusión retrógrada, a 37°C. El protocolo consiste en perfundir el corazón con 3 soluciones diferentes de forma consecutiva:

1. Solución B1: contiene una concentración 1,2 mM Ca^{2+} ; la cual fue perfundida por 3 min o hasta que el corazón estuviera libre de sangre.
2. Solución B2: contiene una concentración 50 mM Butanodiona y carece de Ca^{2+} (+ 5mM EGTA); la cual fue perfundida hasta que el corazón dejara de contraerse.
3. Solución de Digestión: solución B1 con 2,385 U de colagenasa tipo II (Worthington), 0.13 mg/ml de proteasa XIV (Sigma-Aldrich), 50 mM Butanodiona y 25 μM Ca^{2+} ; fue perfundida por 20 min, en recirculación, para digerir el corazón.

4. Digestión externa: finalmente el corazón fue retirado de la bomba y cortado en pequeños trozos para luego proseguir su digestión en un vaso precipitado con 50 μM Ca^{2+} . La $[\text{Ca}^{2+}]$ fue aumentada gradualmente hasta 2 mM Ca^{2+} .

El tejido sobrante fue disgregado pasándolo a través de una pipeta Pasteur de plástico con la boquilla cortada. Finalmente, el remanente del corazón fue filtrado usando un filtro de 500 μm aproximadamente y dejado reposar por 10 min; dado el tamaño de los cardiomiocitos adultos, aquellos en condiciones viables tendían a precipitar por gravedad, dejando las células muertas y otros tipos celulares en el sobrenadante.

Los cardiomiocitos en buenas condiciones, es decir que al observarlos mediante el microscopio estaban birrefringentes, fueron sembrados en las placas de trabajo pre-tratadas durante 16 horas con laminina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ preparada en PBS estéril), por 2 horas, hasta ser usados para experimentación (74).

5.4 Medición de calcio intracelular

Con el fin de determinar el cambio del Ca^{2+} intracelular durante el ciclo de contracción y relajación, los cardiomiocitos, previamente sembrados sobre cubre-objetos cubiertos con laminina, fueron incubados con la sonda afín a Ca^{2+} Fluo 4 AM (1 μM , Molecular Probes) por 90 min, y a 37° C, para luego mantenerlos en una solución Hank's con 2 mM Ca^{2+} . Posteriormente, los cubre-objetos conteniendo las células cargadas con la sonda fueron montados en un microscopio invertido (Olympus IX-81, UPLFLN 40 XO 40x $\times/1.3$ objetivo de inmersión en aceite). Los experimentos fueron realizados en una cámara de perfusión (RC-27NE Warner Instruments) con un dador de pulso externo fijado entre 6 y 8 V, de 2 ms de duración, y con una frecuencia de 0,2 Hz durante un total de 120 segundos. La sonda Fluo 4 fue excitada, a 494 nm y la fluorescencia emitida, filtrada a 510 nm, la cual fue recolectada con una frecuencia de 12 Hz, usando una cámara sCMOS (pco-EDGE). Para cada experimento la señal fue grabada, y la intensidad de fondo

sustraída, usando una región de interés (ROI) ubicada fuera de las células. Pasado los 120 segundos, la solución externa fue reemplazada por una solución sin Ca^{2+} externo (5 mM EGTA) y el estímulo eléctrico fue suspendido. Finalmente, se agregaron 10 mM de cafeína a la solución externa para promover la apertura de los RYR y por ende, la liberación de Ca^{2+} desde el RS.

Este ensayo nos permitió estudiar la intensidad del cambio de la señal de Fluo 4 de cada transitorio (aumento de Ca^{2+} máximo), el tiempo que demora en llegar al máximo (medida indirecta del proceso de CICR) y la velocidad de disminución de la concentración de Ca^{2+} (medida necesaria para establecer la actividad de la SERCA2), ajustando este proceso a una exponencial simple.

La liberación máxima de Ca^{2+} del RS fue determinada por la intensidad del cambio en la señal de Fluo 4 luego de la aplicación de 10 mM cafeína, mientras que la actividad de NCX fue establecida ajustando una exponencial simple al decaimiento de esta señal (74).

5.5 RT-PCR

El ARN total de los cardiomiocitos fue extraído con el compuesto TRIzol desde un homogeneizado de tejido, según indicaciones del productor. Las muestras fueron tratadas con DNasa I (Invitrogen, Inc), previo a la síntesis de ADN complementario, para eliminar el ADN genómico, mientras que el ADNc monocatenario fue transcrito de forma reversa con 100ng de ARN total por RT-PCR, utilizando QPCR cDNA Synthesis Kit AffinityScript™ II (Stratagene Inc.)(74).

5.6 PCR semi-cuantitativa

La técnica de RT-PCR semi-cuantitativa fue realizada utilizando un termociclador Stratagene MX300P (Stratagene). Como control interno fue utilizada una amplificación en PCR del ARN 18S. Las reacciones de PCR fueron realizadas con Brilliant SYBR verde (Agilent technologies). La cantidad de ARNm específico fue calculado como la relación entre éste y el 18S, en cada muestra determinada, y en duplicado (74). Para cada gen fueron utilizados dos oligonucleótidos, un sentido (S) y uno antisentido (AS). A continuación son detallados los cebadores para cada gen en estudio.

Oligonucleótido	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
SERCA2a	ATTGTTCGAAGTCTGCCTTCTGTGG	CATAGGTTGATCCAGTTATGGTAAA
PLB	TACCTTACTCGCTCGGCTATC	CATAGGTTGATCCAGTTATGGTAAA
NCX1	CTTCGTCCCACCTACAGAAT	TGGTAGATGGCAGCAATGGA
BNP	AGAACAATCCACGATGCAG	CCTTGGTCCTTTGAGAGCT
18s	GGGCCCGAACGCTTTACTTT	TTGCGCCGGTCCAAGAATTT

Tabla 1. Secuencias sentido y antisentido para cada oligonucleótido utilizado.

Bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), fosfolamban (PLB), intercambiador sodio/calcio (NCX), péptido natriurético tipo B (BNP) y ARN ribosomal 18s.

5.7 Mediciones bioquímicas: Ensayo Inmunoblot (Western Blot)

En esta tesis, las proteínas fueron obtenidas a partir de homogeneizados de tejido utilizando un buffer de lisis, que incluía EDTA como quelante de calcio, y además un cocktail de inhibidores de proteasas (Calbiochem) con el fin de evitar la degradación de las muestras. Los corazones fueron homogeneizados manualmente con homogeneizadores de vidrio, los cuales fueron sumergidos en una cama de hielo profunda, para prevenir de mejor manera la degradación proteica. Luego los homogeneizados fueron incubados una hora en agitación, y a 4°C. Una vez finalizado este tiempo, fueron centrifugados a 13000 rpm, por 10 min a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes, conteniendo los extractos de proteínas, fueron colectados y almacenados a -80°C, hasta ser usados.

Para la electroforesis de estos extractos proteicos, fueron usados geles al 6, 10 y 15% de Bis-acrilamida lo que nos permitió separar proteínas en un rango entre 75 y 250 kDa, de 50 a 100 kDa y de 0 a 50 respectivamente. Una vez finalizada la corrida de las muestras, éstas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) afín a proteínas, usando un buffer de transferencia preparado en base a Glicina, TRIS y metanol: la transferencia fue realizada a 110 volts por 1 hora y 15 minutos, en frío.

Una vez finalizado el tiempo, la membrana fue incubada con buffer de bloqueo (5% leche en PBS1X 0.1% Tween) en agitación por 1 hora a temperatura ambiente, para bloquear todos los sitios donde no fueron transferidas proteínas. Transcurrida la hora, la membrana fue cortada en fragmentos, tomando como referencia los pesos moleculares del estándar de proteínas y de las proteínas en estudio: en este caso, la subunidad $Ca_v1.2$ (220-240 kDa), la subunidad β (aproximadamente 80 kDa), el NCX1 (aproximadamente 120 kDa), la SERCA2a (aproximadamente 100 kDa), la PMCA2 (aproximadamente 140 kDa), forma monómera del fosfolamban fosforilado (aproximadamente 10 kDa) y el control de

carga, GAPDH (35 kDa). En el caso particular de la proteína fosfolamban, fue utilizado un gel 15% bis-acrilamida, debido a que la forma monómera fosforilada de éste pesa aproximadamente 10 kDa. La forma pentámera del fosfolamban no pudo ser evaluada debido al tratamiento previo realizado, ya que fueron utilizados detergentes que impiden la oligomerización de esta proteína. Cada membrana fue dejada en incubación con el anticuerpo respectivo, preparado en buffer de bloqueo: LTCC (ACC-003, Alomone 1:200), NCX1 (AB3516P, Alomone 1:200), SERCA2a (A010-20, Thermo Fisher 1:1000) y fosfolamban (A1, Badrilla 1:5000), en agitación, y a 4°C durante toda la noche. En la mañana siguiente fueron realizados 5 lavados con PBS1X 0.1% Tween, de 5 minutos cada uno y en un agitador orbital.

Una vez finalizados los lavados, los anticuerpos secundarios (anti conejo conjugado a la enzima peroxidasa de rabanito, HRP) fueron agregados, los cuales fueron preparados nuevamente en buffer de bloqueo, en dilución 1:3000. La incubación de estos anticuerpos fue realizada por 1 hora a temperatura ambiente, y en un agitador orbital. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas 5 veces con PBS1X 0.1% Tween, siendo cada lavado de 5 minutos de duración. Finalmente cada membrana fue incubada con el reactivo ECL (Thermo) el cual contiene el sustrato para la enzima HRP: el resultado de la acción enzimática fue una señal quimioluminiscente que fue detectada por el equipo fotodocumentador (74).

VI. Análisis estadístico

Los datos están expresados como medias \pm error estándar. El análisis estadístico de los datos fue realizado con el programa Graphpad Prism 6 mediante la prueba Wilcoxon-Mann-Whitney y fue considerado significativo con $p < 0,1$ para los valores obtenidos en las mediciones ecocardiográficas (debido a la variabilidad dependiente del evaluador), y un valor $p < 0,05$ para el resto de los valores. Para determinar una diferencia significativa mayor al 35%, con un valor p menor a 0,05 y un poder estadístico del 80%, fue estimado que el tamaño muestral total necesario debía ser de, al menos, 16 individuos (12 grupo intervención y 7 grupo control).

VII. Resultados

7.1 Peso corporal y peso cardíaco

La medición del peso cardíaco y corporal mostró que los animales controles en comparación con los animales entrenados presentaron una ganancia de peso corporal mayor durante el período de estudio (el peso corporal medio al final del período de entrenamiento fue de $438,2 \pm 182,8$ en controles y $408,6 \pm 133,5$ en entrenados (Fig. 3a)). El peso cardíaco fue normalizado por el grupo experimental y por la longitud de la tibia, debido a que es un buen control de tamaño corporal, obteniendo un valor de $1 \pm 0,03$ en las ratas controles y $1,11 \pm 0,14$ en entrenadas, sugiriendo que en el grupo experimental fue desarrollada una hipertrofia cardíaca (Fig. 3b).

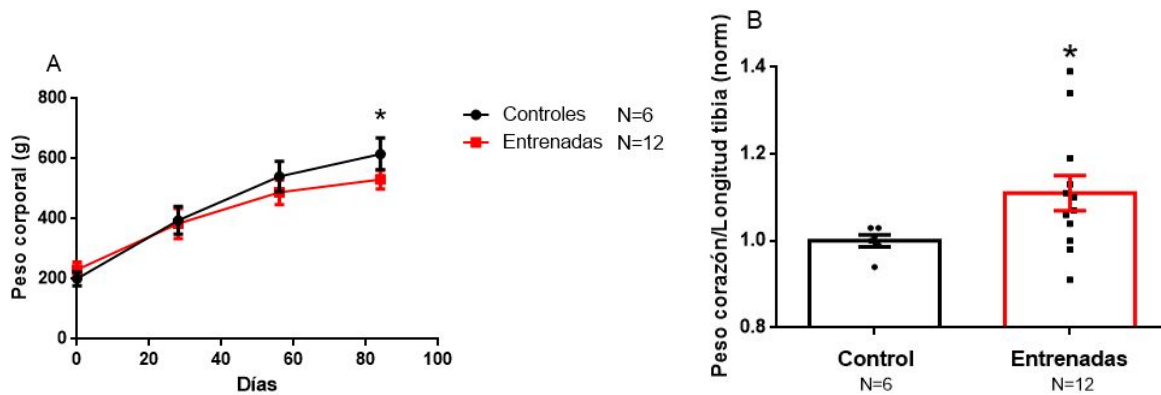
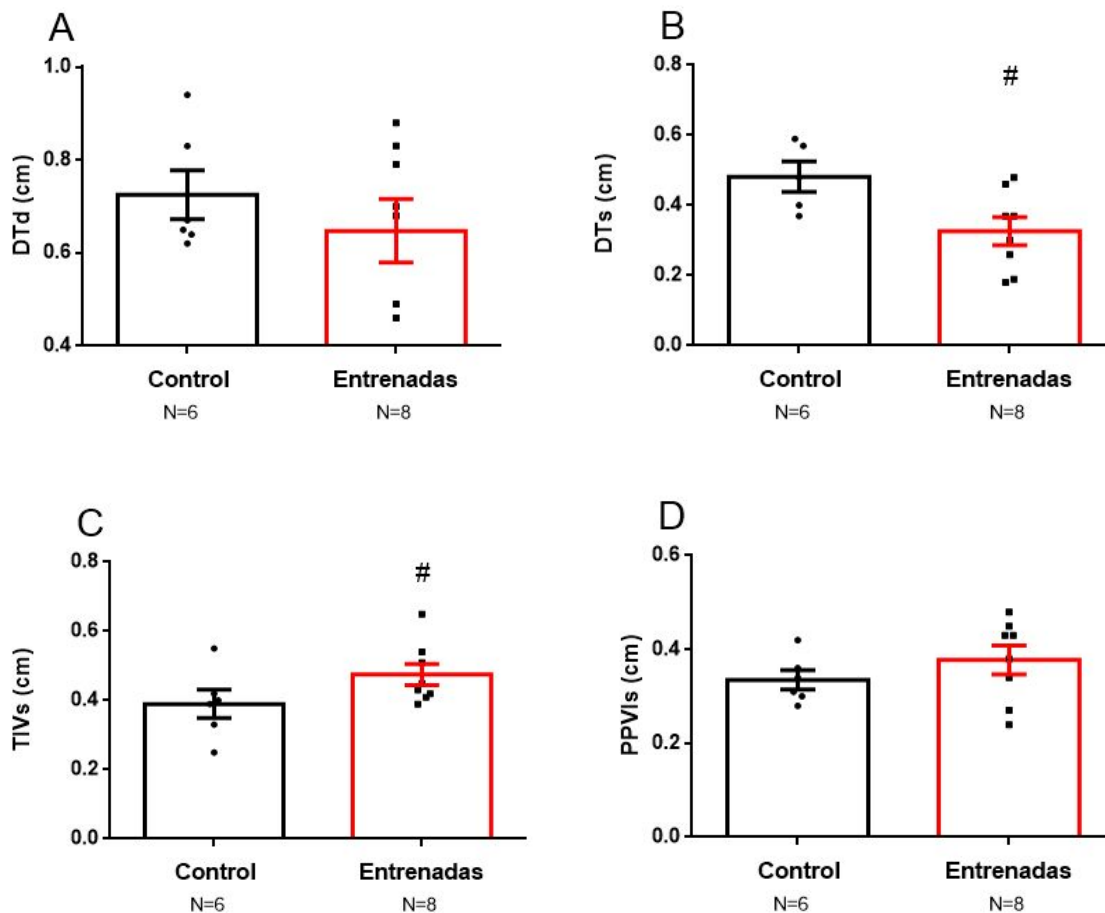


Figura 3. Dimensiones corporales y cardíacas en el período de entrenamiento. Peso corporal registrado al finalizar cada mes de entrenamiento, (A), y peso cardíaco normalizado por longitud de la tibia (B) en grupos control y entrenado. Datos mostrados como media aritmética \pm error estándar. * $P < 0,05$.

7.2 Parámetros Ecocardiográficos

Una vez completados los meses de entrenamiento, previo a la eutanasia de los animales, fue realizado un análisis de ecocardiografía con la colaboración del Dr. Juan Pedro Peña. Este procedimiento fue llevado a cabo con los animales anestesiados usando $\frac{1}{3}$ de la solución de ketamina-xilacina necesaria para eutanasia (según peso corporal). Con respecto a los parámetros morfológicos, el DTd no mostró diferencias entre ambos grupos (Fig. 4a), pero el DTs fue menor en ratas entrenadas ($0,32 \pm 0,04$ cm) comparadas con ratas controles ($0,48 \pm 0,04$ cm) (Fig. 4b). Por otro lado, el TIV también mostró diferencias entre ambos grupos, siendo mayor en ratas entrenadas versus las controles ($0,47 \pm 0,03$ y $0,39 \pm 0,04$ cm, respectivamente) (Fig. 4c), mientras que la PPVI no mostró diferencias significativas (Fig. 4d).



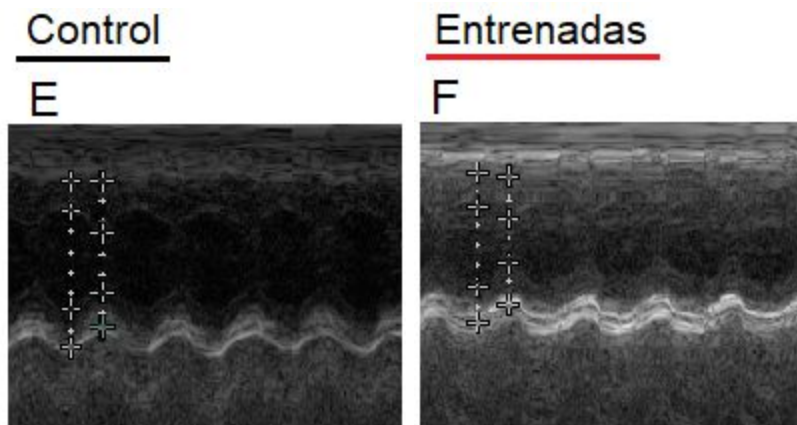


Figura 4. Parámetros morfológicos evaluados mediante ecocardiografía en ratas controles y en ratas entrenadas. En A es mostrado el diámetro telediastólico (diámetro ventricular en diástole, DTd); en B, el diámetro telesistólico (diámetro ventricular en sístole, DTs); en C, el grosor del tabique interventricular en sístole (TIVs) y en D, el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en sístole (PPVIs). En E y F se muestra una imagen representativa del modo M en controles y entrenadas respectivamente. Datos mostrados como media aritmética \pm error estándar. # $P < 0,1$.

En cuanto a los parámetros funcionales evaluados, en ratas entrenadas hubo una disminución en la FC, presentando $258 \pm 3,9$ versus $285,3 \pm 6,2$ latidos por minuto en las ratas controles (Fig. 5a). Además fue detectado un aumento en la fracción de acortamiento sistólico (FAS) de aproximadamente un 20% más en ratas entrenadas (Fig. 5b); se observó un aumento en la fracción de eyección en ratas entrenadas ($84,5 \pm 6,1$ %) al compararlas con controles ($79 \pm 4,9$ %) (Fig. 5c), y también en la razón E/A (Fig. 5d), donde las ratas entrenadas obtuvieron un valor de $2,2 \pm 0,3$ y las controles un valor de $1,8 \pm 0,2$. En resumen, los resultados ecocardiográficos, tanto morfológicos como funcionales, indican una mayor eficiencia en el volumen expulsivo, debido a un menor diámetro al final de la sístole, y a una mejorada fracción de eyección. Por otro lado, la razón E/A indicaría una mejora en la relajación ventricular izquierda, y por ende, un llenado acelerado.

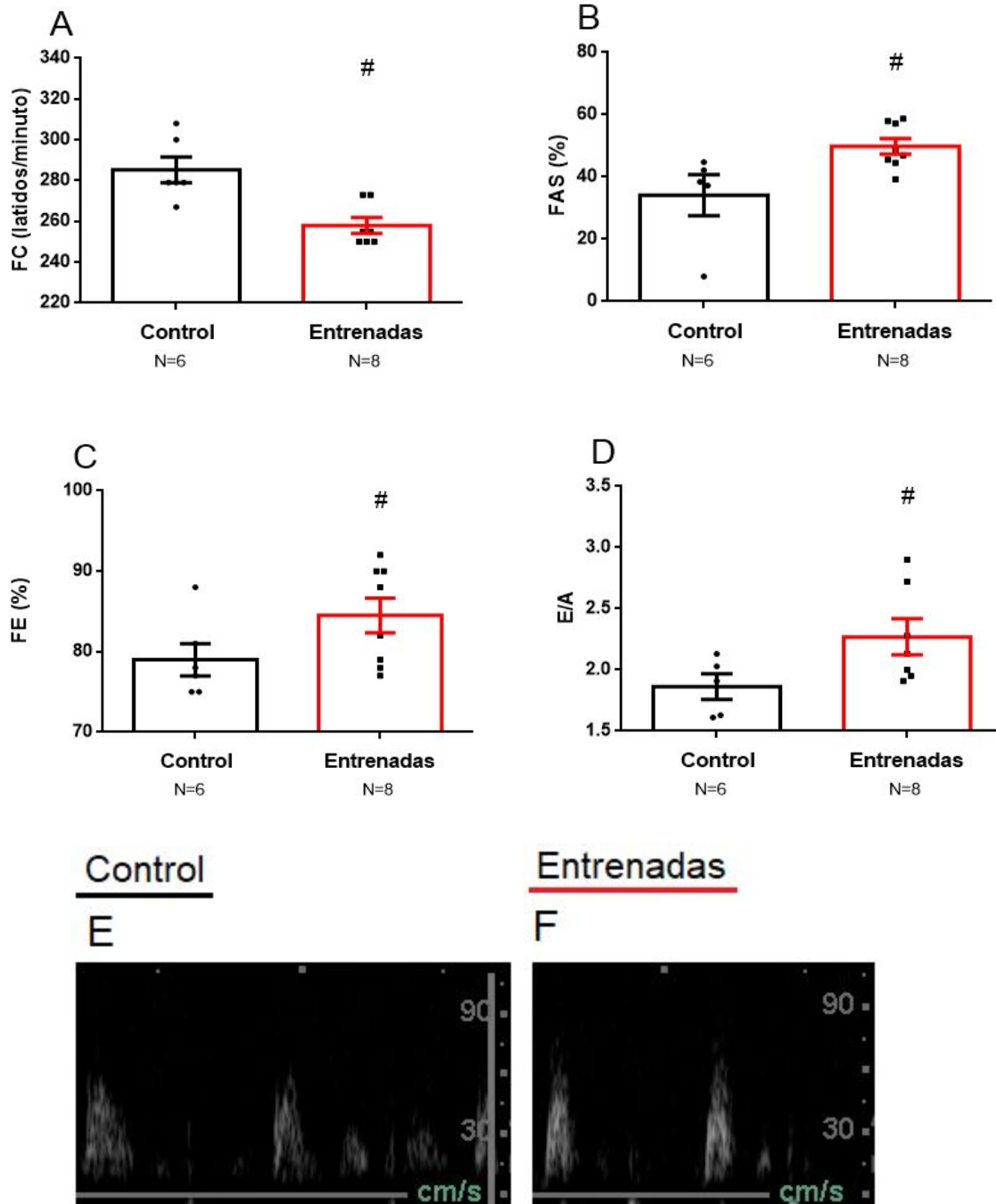


Figura 5. Parámetros funcionales evaluados mediante ecocardiografía en ratas controles y en ratas entrenadas. En A es mostrada la comparación de las frecuencias cardíacas en reposo; en B, la fracción de acortamiento sistólico (FAS); en C, la fracción de eyección (FE) y en D, es presentada la razón entre la onda E y la onda A, para los grupos control y entrenado. En E y F se muestra una imagen representativa de la razón E/A para controles y entrenadas respectivamente. Datos mostrados como media aritmética \pm error

estándar. # P < 0,1.

7.3 Histología

El análisis histológico fue realizado examinando las muestras de corazón de 6 ratas controles y 12 ratas del grupo experimental, evaluando, para cada animal, 2 cortes diferentes que presentaban una disposición longitudinal de las fibras musculares. De cada corte, fueron realizadas 30 medidas de las distancias transversales de los cardiomiocitos a nivel transnuclear. Este análisis fue realizado por múltiples tomas de datos aleatorias de distintos cortes, para evitar sesgos. El análisis de las muestras histológicas obtenidas de ratas controles y de las entrenadas mediante nado, resultó en un aumento en el ancho de los cardiomiocitos de ratas nadadoras cuando se compara con los de ratas controles, lo cual sugiere el desarrollo de hipertrofia a nivel celular (Fig. 6c). Por su parte, la evaluación de la tinción de Masson no mostró diferencias en el contenido de colágeno, entre ambos grupos (Fig. 6d y 6e), indicando que la hipertrofia desarrollada no era patológica.

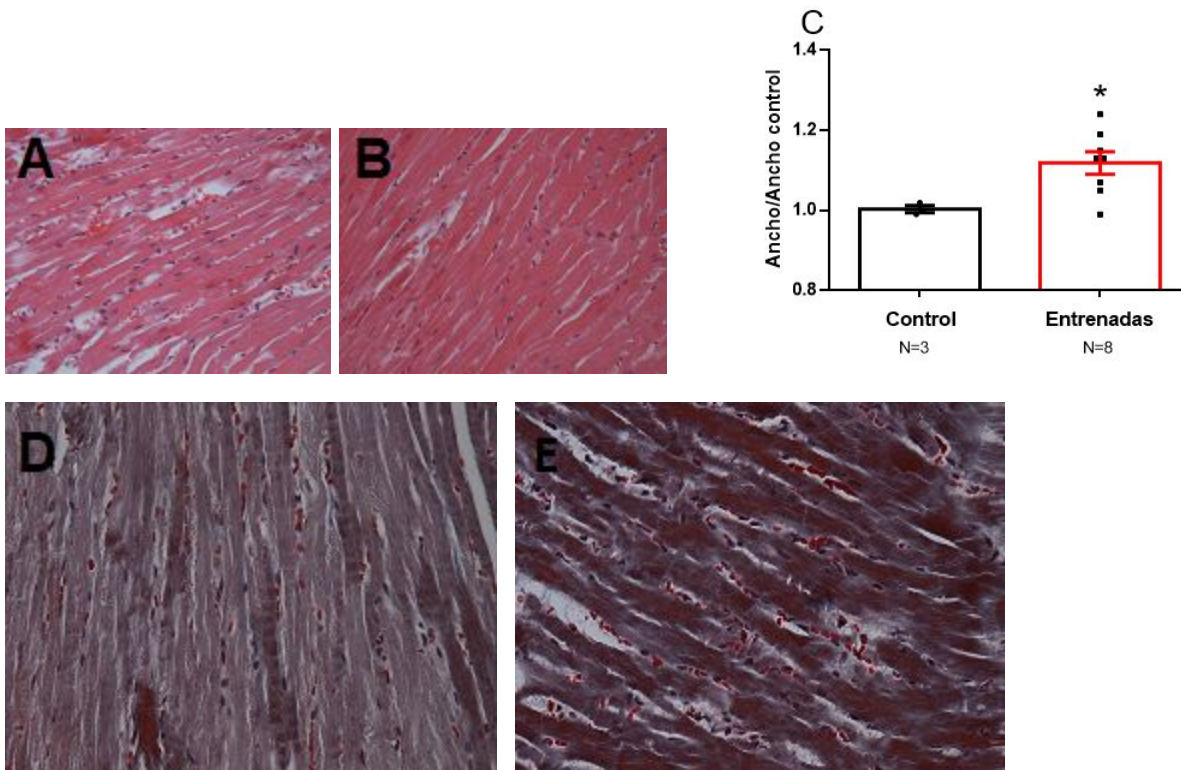
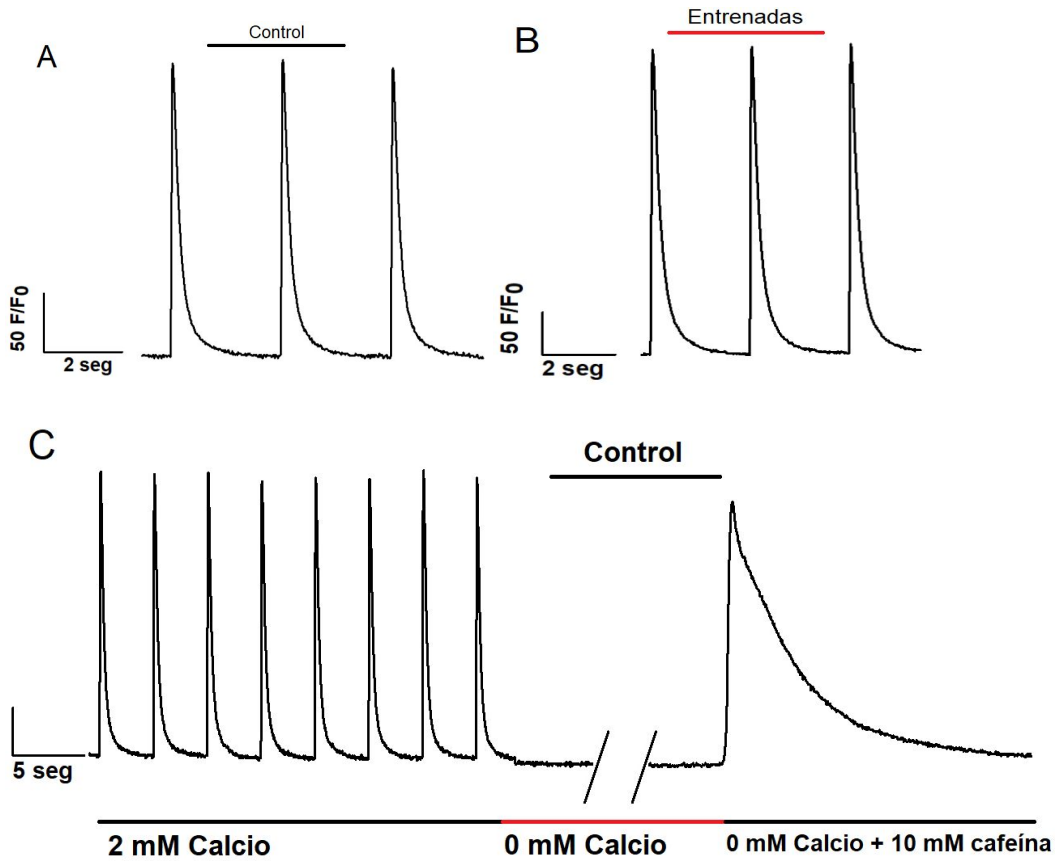


Figura 6. Características morfológicas de cardiomiocitos de ratas entrenadas y controles. Tinción hematoxilina-eosina y tinción de Masson, en cortes de ápice de corazón de ratas entrenadas y controles. Cortes representativos de la diferencia en el ancho de los cardiomiocitos de rata control (A) y entrenada (B), su cuantificación (C) y las imágenes de la tinción de Masson para ambos grupos, control y entrenadas, respectivamente (D y E). Datos mostrados como media aritmética \pm error estándar. * $P < 0,05$.

7.4 Imágenes de calcio

Con el fin de determinar si el entrenamiento físico produce cambios en la cinética del Ca^{2+} intracelular fueron extraídos cardiomiocitos del ventrículo izquierdo de ratas entrenadas y de ratas controles, los que fueron posteriormente sembrados en cubreobjetos pretratados con laminina y luego, cargados con la sonda afín a Ca^{2+} , Fluo 4-AM. De cada grupo fueron utilizados los cardiomiocitos de 3 ratas. Una vez que las células estuvieron cargadas, fueron entonces estimuladas con un dador de pulso, a una frecuencia de 0,2 Hz, y visualizadas en el microscopio de fluorescencia. En la figura 7A es mostrada una imagen representativa del cambio de fluorescencia obtenida de un cardiomiocito proveniente de ratas controles y en la figura 7B, una obtenida de un cardiomiocito proveniente de ratas entrenadas. En 7C y 7D se muestran los registros representativos para el grupo entrenado y control respectivamente. La cuantificación de la caída del transitorio (relajación del cardiomiocito) fue realizada mediante un ajuste exponencial simple, y promediado entre cada muestra; este resultado mostró la ausencia de diferencias entre los transitorios de ratas controles y entrenadas (Fig. 7E). Por otro lado, en presencia de un estímulo con 10 mM cafeína, con previa eliminación de Ca^{2+} extracelular mediante EGTA, fue observado para cada una de las mediciones, un aumento en la diferencia entre la máxima amplitud del transitorio y de la estimulación con cafeína, al comparar ratas entrenadas con ratas controles (Fig. 7F). La cuantificación de la caída en la concentración de Ca^{2+} , posterior a la estimulación con cafeína 10 mM, y al ajuste exponencial simple, mostró una velocidad de caída más rápida en ratas entrenadas al compararlas con controles. Esto se muestra cuantificado en la figura 7G.



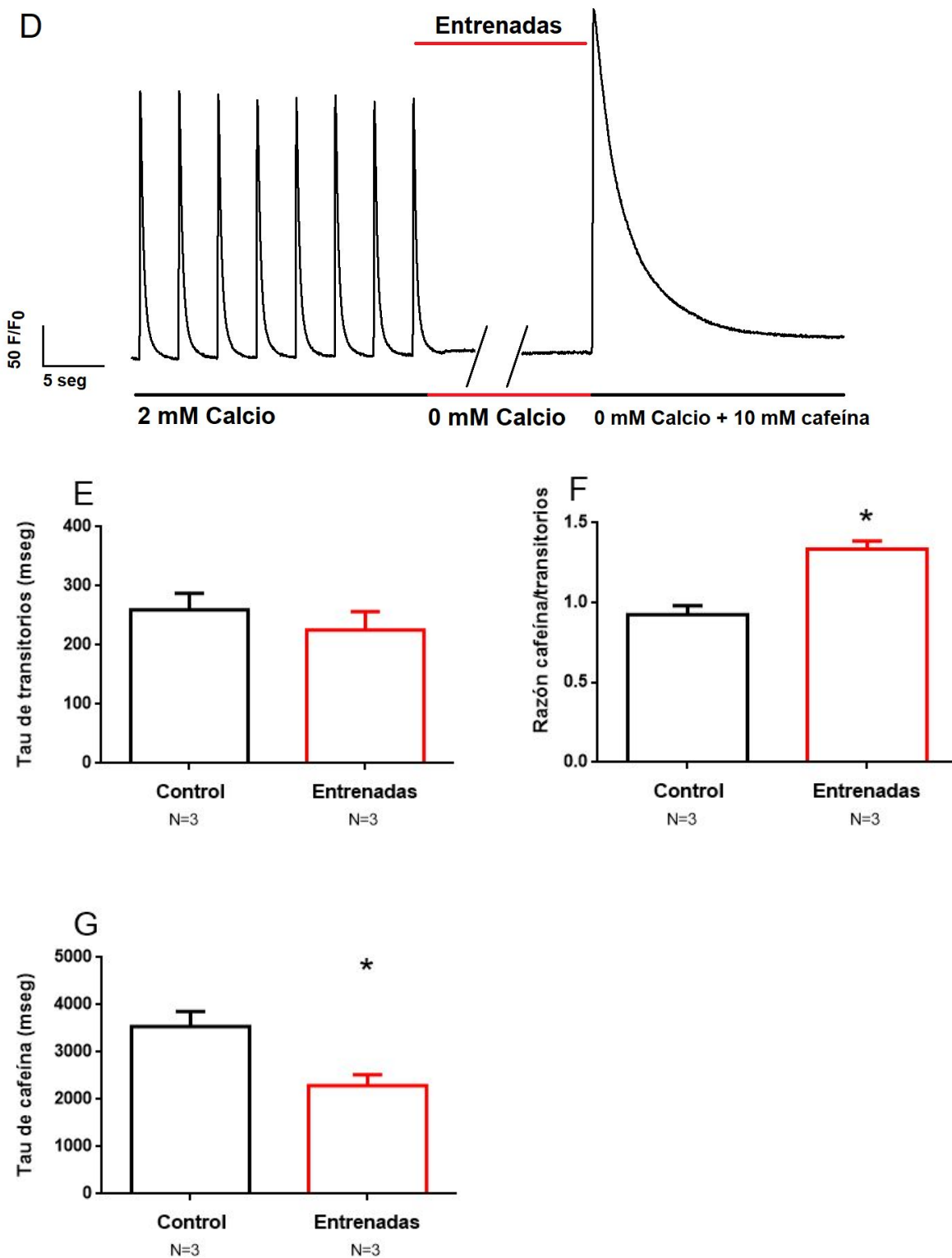


Figura 7. Evaluación de las cinéticas del Ca²⁺ intracelular en cardiomiocitos de ratas entrenadas y controles estimulados eléctricamente, usando la sonda Fluo4. En la

figura son mostrados transitorios de Ca^{2+} representativos, tanto de ratas controles (A) y como de ratas entrenadas (B). A continuación es mostrado el efecto de un protocolo de estimulación con cafeína, en ratas controles (C) y en entrenadas (D). La comparación y cuantificación del tau de los transitorios entre ambos grupos es mostrado en E. La comparación entre grupos de la diferencia entre la amplitud del estímulo con cafeína y los transitorios es mostrada en la figura F. La cuantificación y comparación entre grupos del tau de cafeína es mostrado en G. Datos mostrados como media aritmética \pm error estándar. * $P < 0,05$.

7.5 Expresión génica

El análisis de la expresión génica fue realizado, inicialmente, mediante la técnica de transcriptasa reversa con la cual fue obtenido el ADN complementario a partir del ARNm extraído de las muestras de corazón. Posteriormente, usando los ADN complementarios obtenidos fue realizado un protocolo de qPCR para determinar las veces de cambio, en la expresión génica, mediante el fluoróforo SYBR Green, el cual se asocia a la molécula de ADN y emite fluorescencia en presencia de doble hebra. Como control de expresión fueron utilizados los oligonucleótidos del 18s, el cual corresponde a ARN estructural ribosomal en células eucarióticas, y por ende, un componente básico en estas células. Para el ensayo fueron utilizadas aquellas muestras cuyo ciclo umbral del 18s fuese menor a 10; esto fue realizado debido a que reacciones más tardías a ésta, reflejan una disminución significativa del ARN de la muestra en cuestión. En la figura 8 son mostrados los resultados del análisis semi-cuantitativo para cada uno de los genes evaluados.

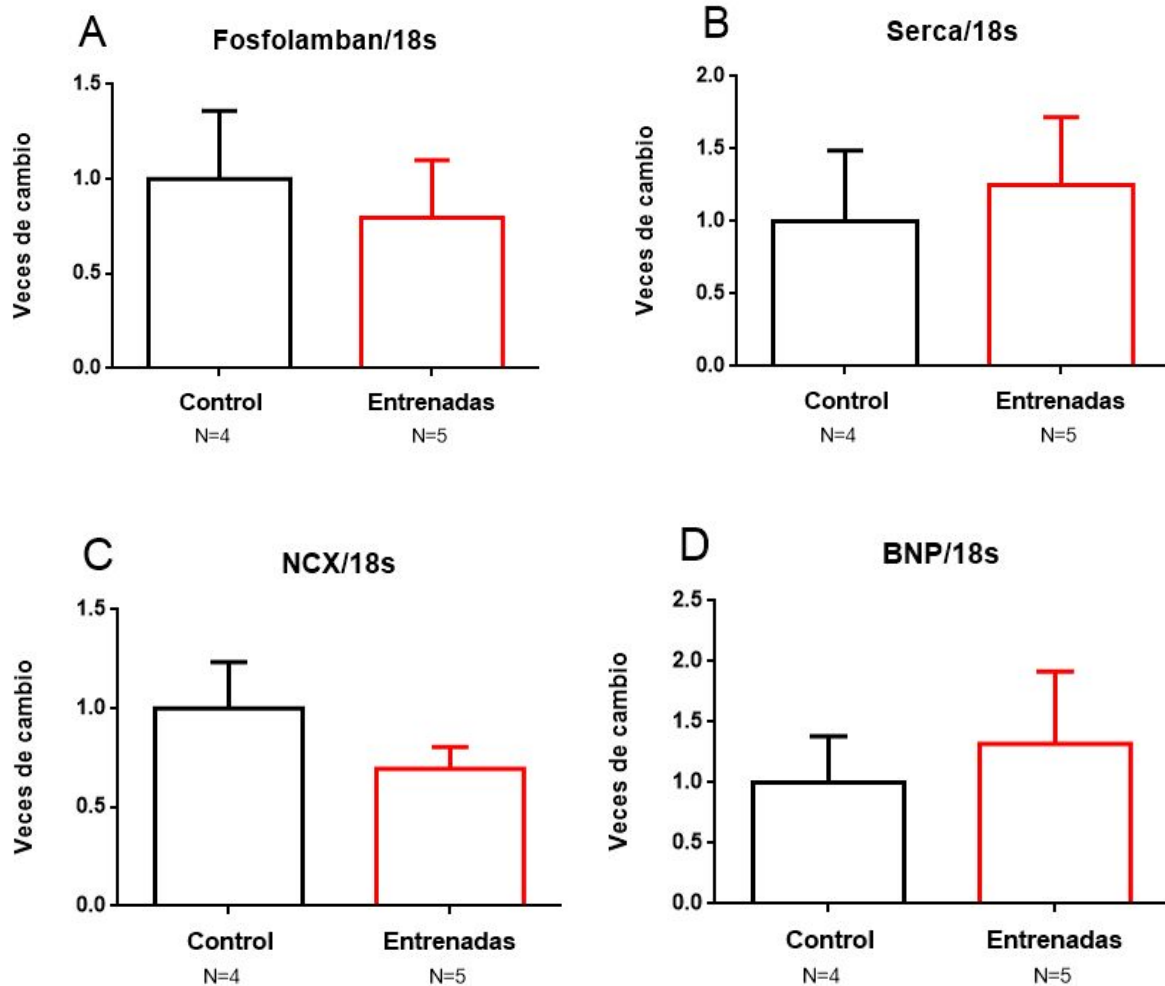


Figura 8. Evaluación del cambio en la expresión génica en muestras de ADN complementario de ratas controles y entrenadas. En la figura, es mostrada la expresión de los genes de las proteínas de membrana del retículo sarcoplásmico; fosfolamban (A) y SERCA (B), el intercambiador sodio/calcio (NCX) presente en la membrana sarcoplásmico (C), y el péptido natriurético tipo B (BNP), el cual es un marcador de hipertrofia patológica (D). Datos mostrados como media aritmética \pm error estándar.

Estos resultados muestran que no existen diferencias en los transcritos de ARN mensajero, tanto para los genes que codifican para proteínas involucradas en el manejo del calcio intracelular (PLB, SERCA y NCX), como tampoco para el BNP el cual, al estar elevado, es un marcador importante de desarrollo de hipertrofia patológica.

7.6 Expresión proteica

Con el fin de evaluar si las diferencias morfológicas y funcionales cardiacas observadas en las ratas entrenadas estaban, de alguna forma, relacionadas con aspectos moleculares, el siguiente paso fue evaluar cambios en el patrón de expresión de las proteínas fundamentales en el funcionamiento cardiaco, y puntualmente, en la CICR. Para ello, utilizamos la técnica de Inmunoblot, la cual había sido previamente estandarizada en nuestro laboratorio para la subunidad poro del canal $Ca_v1.2$ y su subunidad auxiliar $Ca_v\beta_2$; por tanto, como punto de partida, fue evaluada la expresión de ambas proteínas. Los resultados obtenidos indican que en las ratas entrenadas existe un aumento en la expresión proteica de esta subunidad poro con respecto a las controles (Fig. 9a y 9b), mientras que la sub-unidad $Ca_v\beta_2$ no presenta diferencias entre ambos grupos (Fig. 9a y 9c).

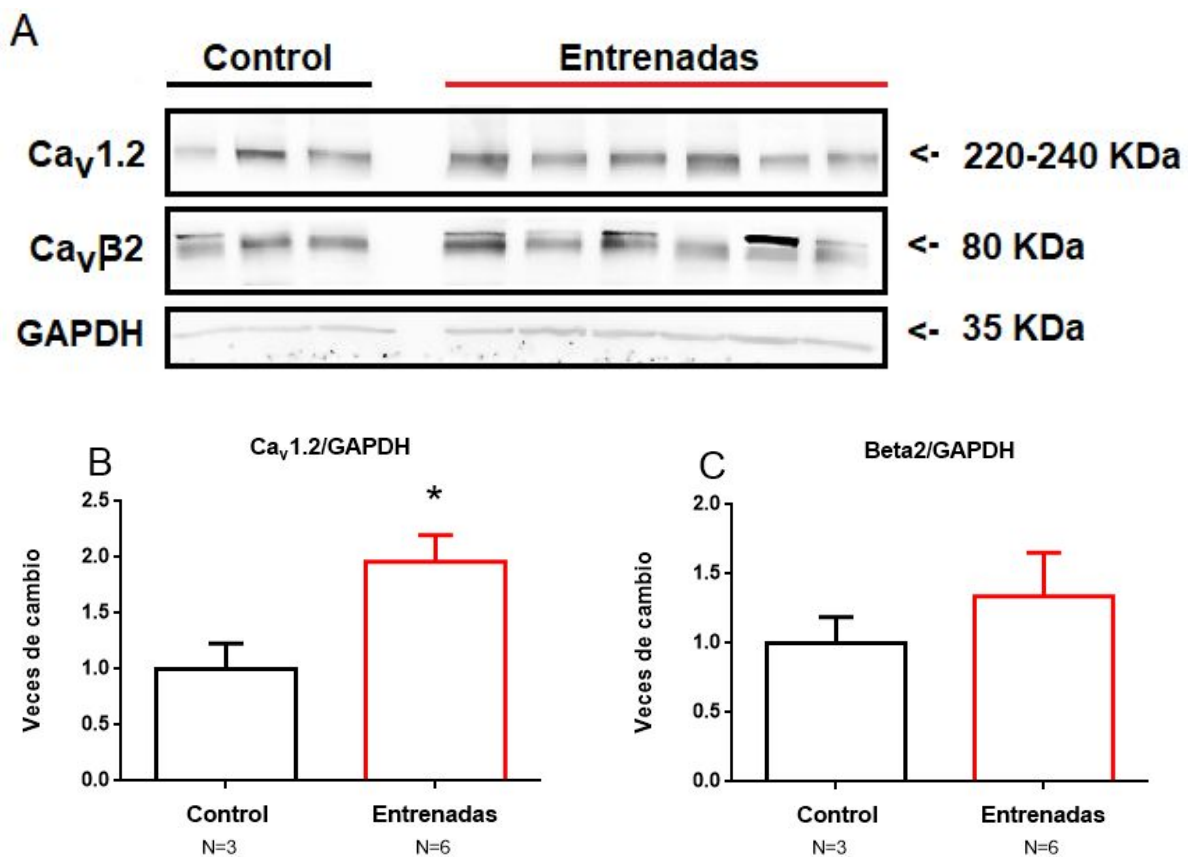
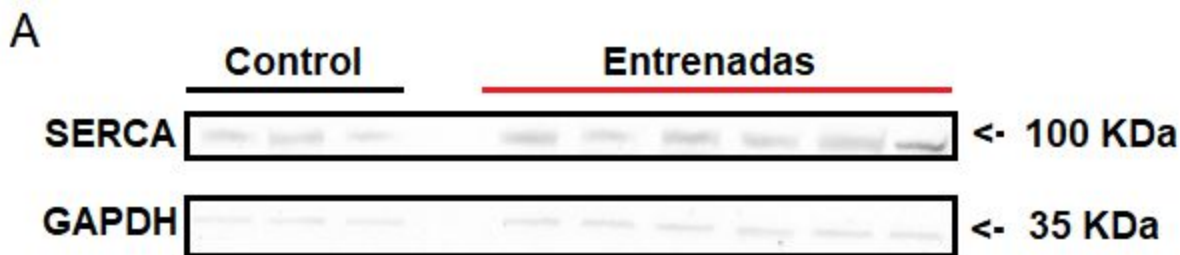


Figura 9. Evaluación de la expresión proteica de $Ca_v1.2$ y su sub-unidad auxiliar $Ca_v\beta_2$, en extractos de corazón de ratas controles y entrenadas mediante ensayo de Inmunoblot. En la figura es mostrada la expresión para el poro del canal de calcio tipo L ($Ca_v1.2$) (A) y su cuantificación (B), la expresión de la sub-unidad auxiliar $Ca_v\beta_2$ (A) y su cuantificación (C); la cuantificación (B y C) fue realizada dividiendo la señal, para cada proteína, por la señal del control de carga utilizado; la proteína gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Datos mostrados como media aritmética \pm error estándar. * $P < 0,05$.

Posteriormente fueron evaluadas las proteínas ubicadas en la membrana del retículo sarcoplásmico encargadas de la recaptación de Ca^{2+} hacia el lumen reticular, las cuales son las principales responsables de producir la relajación del cardiomiocito mediante la disminución del Ca^{2+} intracelular; los resultados obtenidos indican que en las ratas entrenadas hubo un aumento en la cantidad total de SERCA (Fig. 10a y 10b), pero no en la expresión de PLB fosforilado en treonina (Fig. 10c y 10d).



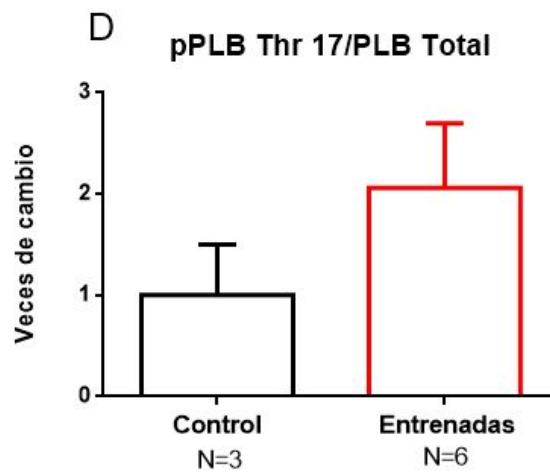
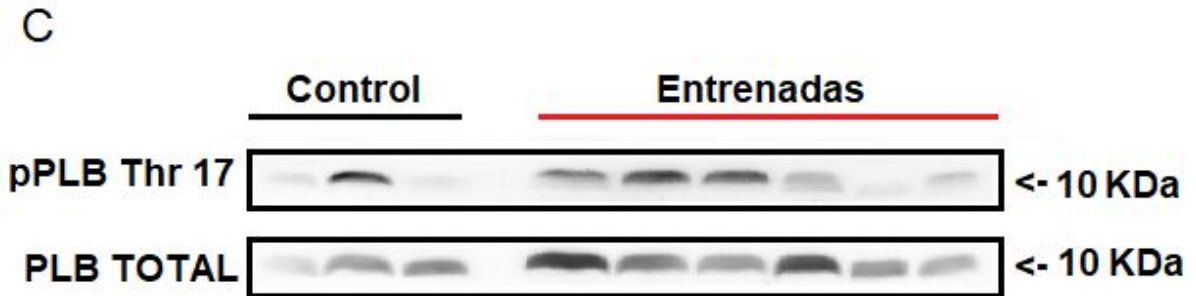
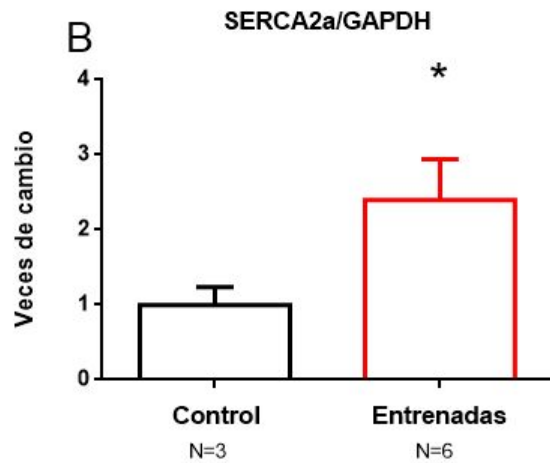
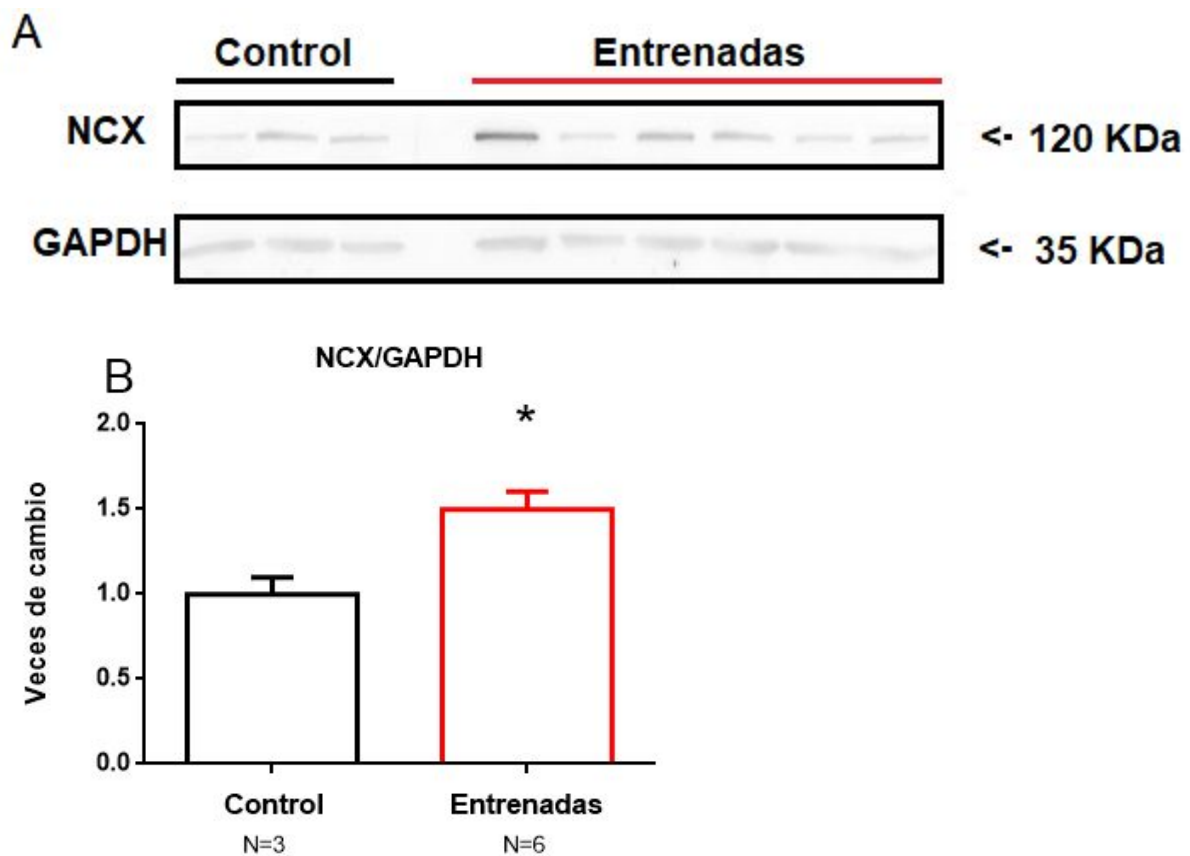


Figura 10. Evaluación de la expresión proteica de las proteínas encargadas de la recaptación de Ca^{2+} en extractos de corazón de ratas controles y entrenadas, mediante ensayo de Inmunoblot. En A es presentada la expresión de SERCA con su control de carga GAPDH. La cuantificación de la señal de la SERCA es presentada en B; en C es mostrada la cuantificación para fosfolamban fosforilado en treonina 17 (pPLB thr 17)

con su respectivo inmunoblot de fosfolamban total como control de carga (PLB Total). Datos mostrados como media aritmética \pm error estándar. * $P < 0,05$.

Por último, fueron evaluadas las proteínas ubicadas en la membrana plasmática encargadas de la extrusión de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular, las cuales contribuyen en menor medida con la disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular, pero cumplen un papel fundamental en la excitabilidad cardiaca; el ensayo de Inmunoblot dejó en evidencia que la cantidad de NCX estaba aumentada (Fig. 11a y 11c) en las ratas entrenadas, mientras que la PMCA no mostró diferencias entre ambos grupos (Fig. 11b y 11d).



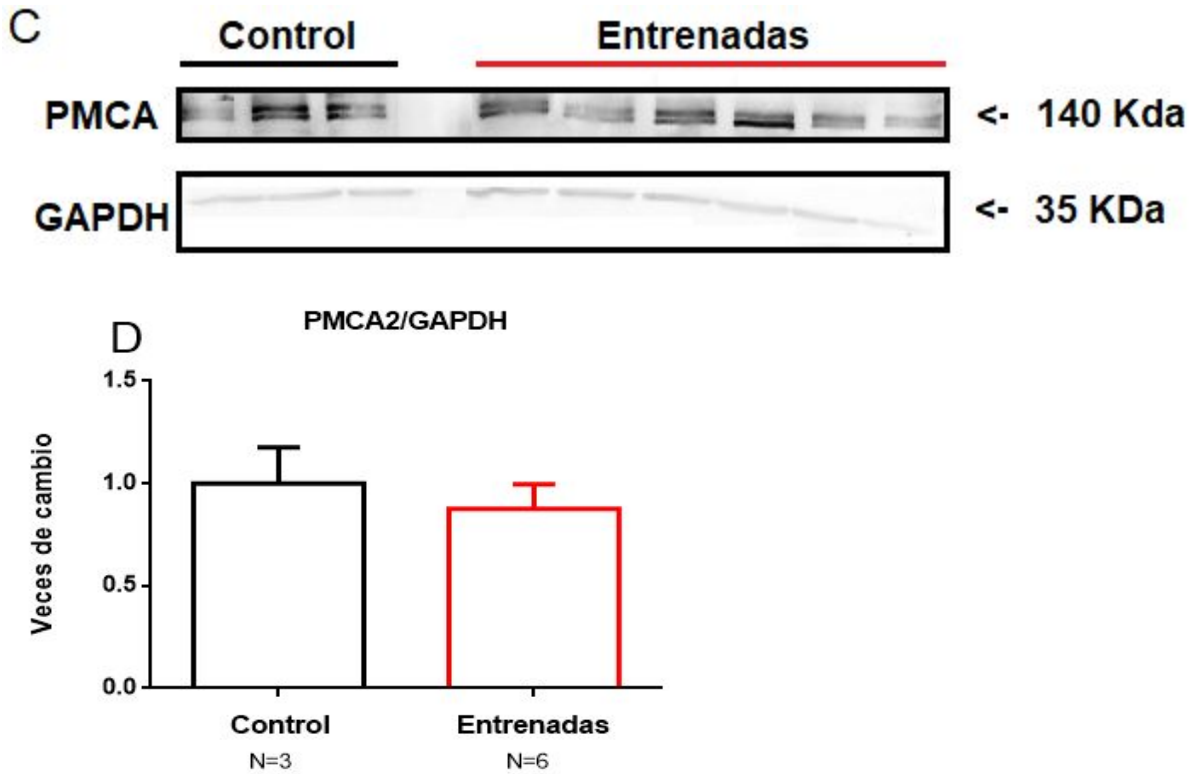


Figura 11. Evaluación de la expresión de las proteínas encargadas de la extrusión de Ca^{2+} en extractos de corazón de ratas controles y entrenadas, mediante ensayo de Inmunoblot. En la figura son mostrados los resultados de la expresión del Intercambiador sodio/calcio (NCX) (A) y de la bomba de calcio de la membrana plasmática (PMCA) (C), y la cuantificación (B y C, respectivamente). Como control de carga fue usada la proteína gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Datos mostrados como media aritmética \pm error estándar. * $P < 0,05$.

VIII. Discusión

Adaptaciones ecocardiográficas

Este estudio muestra como un período de entrenamiento de nado de volumen elevado produjo adaptaciones funcionales en el corazón, las que incluyen modificaciones estructurales, hemodinámicas, proteicas y además, en el manejo del calcio intracelular. Este modelo de entrenamiento mostró que la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida estaba caracterizada por una mejora, tanto en la función sistólica como diastólica, un aumento en el peso del corazón y un incremento en el ancho de las células cardíacas.

En la década del 80, Morganroth (11) propuso que las adaptaciones cardíacas dependían del tipo de sobrecarga hemodinámica producida durante el ejercicio. De acuerdo a su hipótesis, el entrenamiento de resistencia cardiorrespiratoria (endurance, por su traducción al inglés) conlleva, como consecuencia de la sobrecarga de volumen, a una hipertrofia excéntrica del ventrículo izquierdo, incrementando tanto la masa ventricular como el tamaño de la cavidad. Por otro lado, el ejercicio estático de fuerza (resistance, por su traducción al inglés), como consecuencia de la sobrecarga de presión, produciría un aumento de la masa ventricular, pero sin un cambio aparente en el tamaño de la cavidad. Actualmente se entiende que los factores que influyen en el tipo y el grado de hipertrofia no se manifiestan de igual manera en todos los atletas. Al respecto, sabemos que el tipo de deporte, sexo, etnicidad y factores genéticos van a influir en el tipo adaptación (75). Sin duda, el componente más importante que determina el tipo de hipertrofia cardíaca es el tipo de entrenamiento, donde se ha documentado en algunos artículos, que en levantadores olímpicos existe un aumento en la masa ventricular izquierda (76, 77), como también hay otros estudios en los cuales no se ven cambios (78, 79). Además, estos deportistas no muestran mejoras en su función cardíaca al evaluarlos mediante ecocardiografía, lo cual no sucede en sujetos

sometidos a entrenamientos dinámicos (80). Es así como Pavlik determina que en sujetos de entre 19 a 30 años, la hipertrofia del ventrículo izquierdo va a ser producida en un orden jerárquico según disciplina: sujetos no atletas - levantadores de pesas - sprinters - atletas de deportes con balón - atletas de endurance, en orden de menor a mayor adaptación (81). Además, se ha determinado que los atletas de endurance presentan una función diastólica mejorada, mediante razón E/A, al compararlos con atletas de fuerza, los cuales no muestran diferencias en este parámetro (82). Finalmente, Arbab-Zadeh y cols. en el año 2014 lograron identificar el patrón de remodelación de corazones de deportistas sometidos a entrenamiento de endurance a lo largo del primer año, en donde concluyen que el VI aumenta su masa total sin un cambio en su volumen en los primeros 6 meses, pero posterior a esto existe un aumento progresivo en el VDF hasta completar el año de entrenamiento, sin un aumento progresivo de la masa cardíaca (hipertrofia excéntrica) (83).

Las adaptaciones producidas por el ejercicio, en modelos animales, dependen de diversos factores (de ahí su variabilidad), tales como tipo, volumen, intensidad, frecuencia y densidad de la actividad física (84). En la literatura actual son muchos los estudios que presentan modelos de entrenamiento que evalúan modificaciones cardíacas los cuales, como se ha revisado anteriormente, deben presentar características de un entrenamiento de tipo endurance. Entre ellos podemos destacar el entrenamiento de ratas en cinta rodante (85, 86, 87), cinta rodante voluntaria en ratas (88), nado en ratas (23, 89, 90), entrenamiento de ratones en cinta rodante (91), nado en ratones (92), cinta rodante en cerdos (93) y cinta rodante en conejos (94).

Las características más recurrentes en estos diferentes tipos de entrenamiento son la frecuencia de entrenamiento de 5 días por semana y un tiempo de entrenamiento que va desde los 60 hasta los 120 minutos. Por otra parte, uno de los controles que determinan si el tipo de entrenamiento ha sido exitoso para inducir una adaptación cardíaca es la relación peso corazón (o peso del ventrículo

izquierdo) dividido por el peso corporal del animal (85, 86, 87, 95). Sin embargo, en una serie de estudios ha sido observado que existe una disminución en la ganancia de peso corporal en animales sometidos a períodos de entrenamiento, lo cual indicaría que la relación peso corazón/peso corporal no sería del todo precisa para cuantificar una hipertrofia cardíaca (23, 96). Es por esto que al elegir qué tipo de entrenamiento sería usado en este trabajo nos basamos en el trabajo de Radovits y cols., quienes, en base a parámetros ecocardiográficos, obtuvieron resultados asociados a mayores adaptaciones cardíacas (23). Además, un estudio previo observó que la relación peso corazón/longitud de la tibia parecía ser un parámetro más exacto (96) para determinar si el aumento en el peso cardíaco de las ratas entrenadas es mayor al compararlas con las ratas controles, como puede ser observado en la Fig. 3B. Además, en esta tesis observamos un aumento en el grosor de las células miocárdicas (Fig. 6C), lo cual es el reflejo de un aumento en el número de miofibrillas y no en el tamaño de estas (97), siendo este aumento en el ancho consistente con otros estudios (23, 88).

Algunos estudios han sugerido que en sujetos entrenados, tanto en humanos como en modelos animales, existe un aumento en el diámetro telediastólico (31, 98), mientras que en otros (23, 99, 100), al igual que en este estudio, no fueron encontradas diferencias entre ratas entrenadas y controles (Fig. 4A). Por otro lado, al igual que en el estudio realizado por Radovits y cols., en el cual basamos el diseño de nuestro entrenamiento (23), hubo una disminución del diámetro telesistólico (Fig. 4B) y un aumento en la fracción de eyección (Fig. 5C), demostrando una mejor eficiencia de este órgano en animales entrenados. Según D'andrea y cols. (32) los sujetos considerados de élite en sus modalidades deportivas, presentan un llenado rápido (E) predominante por sobre el llenado lento (A). Este parámetro no había sido tomado en consideración por estudios anteriores, pero indicaría una función diastólica mejorada en ratas entrenadas, debido a que la onda E corresponde a la distensión pasiva del ventrículo izquierdo al momento de

abrirse la válvula mitral (Fig. 5D), y la onda A al ingreso de sangre al VI dado por la contracción auricular.

Todos los datos obtenidos previamente indican que el corazón de estas ratas entrenadas está realmente adaptado y es, funcionalmente, más eficiente. De esta forma, este modelo se presenta como adecuado para estudiar los mecanismos moleculares que modulan la mejora tanto en la contractilidad como en relajación cardíaca, específicamente explorando los cambios en la expresión de proteínas involucradas en el manejo del Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, se debe tener siempre presente que el proceso de remodelación producido en estos animales a lo largo de tres meses de entrenamiento es sólo una aproximación del inicio de la adaptación cardíaca, esto es debido a que en sujetos humanos entrenados sólo se observan cambios en el crecimiento de este órgano posterior a los primeros seis meses de entrenamiento (83).

Modificaciones del acoplamiento excitación-contracción-relajación

El proceso de CICR es iniciado por una corriente de Ca^{2+} que ingresa vía el canal $\text{Ca}_v1.2$ (LTCC), permitiendo la unión de este ión al RYR y la consecuente liberación masiva de Ca^{2+} , almacenado en el retículo sarcoplásmico, hacia el citoplasma. Esto genera la unión de este ion al complejo de las troponinas, permitiendo el golpe de fuerza de la cabeza de la miosina contra la actina, produciendo así la contracción. El proceso de relajación del cardiomiocito es comandado por la SERCA, cuya actividad es regulada por PLB, que en su estado fosforilado conlleva a una mayor actividad de SERCA y por tanto a una re-captación aumentada hacia el retículo sarcoplásmico. Otras proteínas involucradas en este proceso de relajación son el NCX y la PMCA, las cuales están ubicadas en la membrana plasmática del cardiomiocito, permitiendo la extrusión de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular (39).

Mediante la aislación de cardiomiocitos y el uso de la sonda fluorescente afín a Ca^{2+} , Fluo-4 AM, en este estudio fueron evaluadas las cinéticas de Ca^{2+} , tanto ante

un estímulo eléctrico constante como uno químico con 10 mM de cafeína. Al evaluar la forma y duración de los aumentos de fluorescencia a lo largo del tiempo, fue observado que no hay diferencias aparentes en los transitorios de Ca^{2+} de ambos grupos, lo cual refleja que no existe un aumento en la recaptación de este ión (Fig. 7E) por parte, principalmente, de la SERCA. A pesar de esto, fue observado un aumento en la cantidad total de ésta proteína (Fig. 10A y 10B), lo cual es consistente con otros estudios (66), pero no de su proteína reguladora, PLB, específicamente fosforilado en treonina 17 (Fig. 10A y 10C).

En este sentido, es ampliamente aceptado que la fosforilación de PLB en serina 16 es dependiente de PKA (101), y que la de treonina 17 es mediada por CaMKII (102), estando esta última implicada en la aceleración de la relajación ventricular dependiente de la frecuencia, es decir, ante una mayor frecuencia cardíaca, una mayor fosforilación de PLB será inducida, permitiendo así una re-captación aumentada de Ca^{2+} vía SERCA2a, y una relajación ventricular apropiada para producir un llenado suficiente (103). Si bien, no existen cambios en los transitorios de Ca^{2+} entre ambos grupos, se podría especular que la mejora en la función de la SERCA podría determinarse tanto ante un estímulo eléctrico de mayor frecuencia (en este estudio solo se estimuló con una frecuencia de 1 Hz) o ante un agonista beta adrenérgico, lo cual podría simular el aumento de frecuencia cardíaca producida por el ejercicio.

Por otro lado, ante un estímulo con 10 mM de cafeína, fue determinado un aumento en la extrusión de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular en el grupo entrenado (Fig. 7G); esto es debido a que esta molécula administrada a estas concentraciones se une al RYR permitiendo la apertura e impidiendo el cierre de este canal, por lo que la disminución del Ca^{2+} intracelular va a estar mediada principalmente por el NCX y la PMCA. Esta extrusión mejorada podría ser explicada por el aumento observado en la cantidad total del NCX (Fig. 11A y 11B) y no así de la PMCA (Fig. 11C y 11D) en el grupo entrenado, lo que podría significar 3 cosas, a) que existe un aumento en la función de NCX, b) hay una mayor expresión proteica de ésta

proteína en la membrana del sarcolema o c) existe una combinación entre ambos procesos.

Finalmente, al comparar las amplitudes máximas entre los transitorios de Ca^{2+} y la estimulación con cafeína, se observó que en el grupo entrenado existe una razón cafeína/transitorio mayor que en el grupo control (Fig. 7F), lo cual indicaría que en cada transitorio existe una liberación menor de Ca^{2+} al compararlo con la fluorescencia máxima ante un estímulo con cafeína de la misma célula. Esta observación se podría explicar por una mayor cantidad de calcio intrarreticular, como por una respuesta de liberación de calcio inducida por calcio mejorada.

Dado que la sonda sensible a Ca^{2+} utilizada en este estudio no es de carácter razonométrico, no podemos concluir cambios en la cantidad total de calcio al interior del retículo. Sin embargo, trabajos previos han demostrado que en procesos fisiológicos no existen cambios aparentes (104). También podemos descartar que el grupo entrenado presente una concentración intrarreticular menor como consecuencia de un aumento en la función de NCX, ya que este aumento debiese estar acompañado de una disminución tanto en la función como en el número de la SERCA, lo que no se observa en los animales entrenados (105).

De esta forma, si se asume que ambos grupos presentan iguales concentraciones intrarreticulares de Ca^{2+} , esto conlleva a un transitorio de Ca^{2+} de menor amplitud en ratas entrenadas. Como se ha visto anteriormente (37), existe un aumento en la sensibilidad a Ca^{2+} por parte de los miofilamentos, por lo que aumentos menores en la concentración intracelular bastarán para producir una igual contracción cardíaca. Finalmente, podemos especular que la reserva intrarreticular de este ión en cada transitorio en los cardiomiocitos de ratas entrenadas, puede contribuir a manera de mejorar la contracción ante aumentos en la frecuencia cardíaca y por ende en el ejercicio.

Por otro lado, en este estudio fue observado un aumento en la cantidad de $\text{Ca}_v1.2$ total en ratas entrenadas en comparación a las controles (Fig. 9A y 9B), lo

cual difiere de lo encontrado por Saborido y cols., quienes no observaron diferencias en su estudio, lo cual explicaron como una consecuencia de que el estrés cardíaco inducido por su protocolo de entrenamiento no fue suficiente para producir cambios (68). Además, fue observada una expresión proteica del $Ca_v\beta_2$ sin cambios entre ambos grupos (Fig. 9A y 9C), lo cual no descarta que pudiese haber algún cambio en los distintos subtipos de esta proteína. Por ejemplo, se ha visto que $Ca_v\beta_{2b}$ presenta una expresión génica elevada en corazones sanos, mientras que $Ca_v\beta_{2a}$ se ve sobreexpresada en hipertrofia patológica (106). El predominio de esta variante otorga al canal de calcio tipo L una mayor probabilidad de estado abierto (P_o), mientras que otras variantes como la $Ca_v\beta_{2d}$ (107), conllevan a una menor P_o . Por lo tanto, cambios en la expresión de las distintas variantes de $Ca_v\beta_2$ podrían explicar cómo un aumento de la cantidad de canales no se refleja en un aumento aparente de la amplitud de los transitorios de calcio.

Por otro lado, el análisis de los distintos genes que codifican para las proteínas involucradas en el manejo del Ca^{2+} intracelular mediante qPCR, mostró que no existen diferencias entre ambos grupos (Fig. 8), tanto para el PLB, SERCA y NCX, mientras que el BNP, un marcador de hipertrofia cardíaca patológica, no se observó elevado, lo cual refuerza que el modelo de ejercicio utilizado no tiene un proceso patológico asociado. Finalmente, al comparar los resultados del inmunoblot con los de las qPCR realizadas, se puede evidenciar que sí existe un aumento en la cantidad total de proteína SERCA y NCX, lo cual indicaría que otros procesos como modificaciones post traduccionales podrían estar sucediendo en un proceso de entrenamiento físico, pero que aún no existe claridad en ello.

De modo general, la contracción cardíaca es dependiente de Ca^{2+} , específicamente, tanto en la amplitud y duración de sus transitorios, como en la sensibilidad de los miofilamentos a este ión. Para permitir la generación de transitorios adecuados, es necesario que los cardiomiocitos presenten una alta y flexible tasa de tamponamiento de Ca^{2+} . Normalmente la cantidad de este ión unido es de 100:1, comparado con el Ca^{2+} libre en el citosol, y durante el proceso de

contracción, esta relación aumenta a favor del Ca^{2+} libre (108). El buen funcionamiento de este proceso, asegurará una remoción óptima del Ca^{2+} libre, para así lograr una cantidad apropiada de este ión en la próxima contracción cardíaca. Por otro lado, la sensibilidad de los miofilamentos es alta cuando estos están elongados (109), por lo tanto, justo después de la relajación, los miofilamentos son más receptivos a la unión del Ca^{2+} , siendo esta autorregulación un mecanismo clave en la coordinación del proceso excitación-contracción. El perfecto funcionamiento de este proceso se ve alterado en la hipertrofia cardíaca patológica, donde, en la primera parte de este acoplamiento, existe una alteración en la estructura de los túbulos transversales (110), conllevando así a una desorganización entre el $\text{Ca}_v1.2$ y los RYR. Esto se refleja en la disminución en la densidad de LTCCs en los túbulos transversales y un aumento de esta proteína en la superficie de la membrana sarcoplásmica (111). Por otro lado, se ha observado que el proceso patológico influye en los transitorios de Ca^{2+} , debido a que existe una disminución en la amplitud de estos, reflejando una alterada liberación de este ión hacia el citosol (112).

Al realizar la comparación entre el proceso patológico y fisiológico de remodelación cardíaca, se puede observar que el modelo de entrenamiento en ratas produce una “inversión” del proceso patológico a nivel molecular. Donde existe un aumento en la cantidad de LTCCs, lo cual podría influir en una mayor activación del RYR a altas frecuencias, un aumento de la SERCA y de la cantidad de PLB fosforilado dependiente de CaMKII, mejorando así la relajación ventricular. Por otro lado, en corazones patológicos se ve una concentración basal de Ca^{2+} aumentada, lo cual genera una activación crónica de proteínas dependiente de este ión, como la vía calcineurina-NFAT. En cambio, en corazones de ratas entrenadas, se puede especular, que el patrón pulsátil de elevaciones de Ca^{2+} y de la vía IGF/AKT/mTOR van a ser los principales estímulos para producir las adaptaciones vistas en hipertrofia fisiológica, principalmente a través de la activación de CaMKII.

Los cambios en la expresión proteica encontrados en este estudio podrían estar relacionados con factores de transcripción que pudieran ser modificados producto del ejercicio físico, lo cual podría explicar, parcialmente, los resultados obtenidos aquí. Es así como diversos estudios han determinado que la proteína de unión al elemento regulatorio de AMP cíclico (CREB, por sus siglas en inglés) podría jugar un rol importante en el desarrollo de la hipertrofia fisiológica (113). Los transitorios de Ca^{2+} inducidos por la activación del LTCC son particularmente relevantes en la activación de CREB, vía CaMKII, fosforilando a esta proteína en su serina 133 (114), lo cual, interesantemente, también es producido vía AKT (115). Ha sido sugerido que la función de este factor de transcripción parece verse disminuida durante el remodelamiento temprano del corazón, tanto ante un estímulo fisiológico como patológico (116), pero que en el proceso adaptativo que conlleva un proceso de entrenamiento físico ocurre un restablecimiento de la función de esta proteína (posterior al período de entrenamiento), sugiriendo que la pérdida de función inicial podría ser permisiva para el eventual proceso de remodelamiento (117).

Finalmente, estos hallazgos abren la discusión del mecanismo involucrado en el aumento de la expresión de ciertas proteínas, de los factores de transcripción que no fueron evaluados en este estudio, y de los patrones de aumento del Ca^{2+} intracelular que podrían explicar los mecanismos subyacentes a las adaptaciones producidas por el ejercicio a nivel de músculo cardíaco. Cabe destacar a CREB como un posible candidato, debido a que éste está involucrado en el proceso de inicio de remodelamiento cardíaco y de mantención de proporcionalidad entre paredes y cámaras cardíacas y ,por otro lado, las cinéticas del Ca^{2+} se ven como un importante determinante en el proceso de remodelación, donde los aumentos crónicos de este ión van a estar relacionados con la vía calcineurina-NFAT y, por ende, del remodelamiento patológico, mientras que los incrementos pulsátiles de este ión (producidos por el ejercicio), junto con la activación de IGF/AKT/mTOR y períodos adecuados de descanso, van a determinar el desarrollo de una hipertrofia adaptativa del corazón.

IX. Conclusiones

Este estudio es el primero en integrar el estudio de los cambios morfológicos inducidos por el ejercicio a nivel cardíaco, con cambios moleculares relacionados con el manejo del Ca^{2+} intracelular y, por ende, el estudio de estos componentes en un modelo real de adaptación cardíaca inducido por ejercicio. Nuestros resultados sugieren que el corazón de ratas sometidas a un entrenamiento físico de gran volumen presenta una mejora en su eficiencia, lo cual debería verse reflejado en sus dinámicas intracelulares. Debido a esto, creemos que entender los cambios, tanto en expresión génica, proteica y de la cinética del Ca^{2+} intracelular, puede abrir una nueva ventana de estudios referidos a crear y mejorar los tratamientos actuales de rehabilitación cardíaca, tanto en el área del ejercicio adaptado como en farmacología, para así complementar de manera global el tratamiento de estos sujetos.

X. Referencias

- 1- Richardson, R. S. (1998). Oxygen transport: air to muscle cell. *Medicine and science in sports and exercise*, 30(1), 53-59.
- 2- Aaronson, K. D., & Sackner-Bernstein, J. (2006). Risk of death associated with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Jama*, 296(12), 1461-1466.
- 3- Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., ... & Anversa, P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, 344(23), 1750-1757.
- 4- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F. J., Nicol, R. L., McKinsey, T. A., ... & Olson, E. N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 105(10), 1395-1406.
- 5- Ito, H., Hirata, Y., Adachi, S., Tanaka, M., Tsujino, M., Koike, A., ... & Hiroe, M. (1993). Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*, 92(1), 398-403.
- 6- Molkenin, J. D., & Dorn II, G. W. (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annual review of physiology*, 63(1), 391-426.
- 7- Crabtree, G. R., & Olson, E. N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*, 109(2), S67-S79.
- 8- Klee, C. B., Ren, H., & Wang, X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13367-13370.
- 9- Lancisi G: quoted by Zuntz and Schumburg in *Studien zur Physiologie des Marsches*. Berlin. 1902. From his treatise "On the Motion of the Heart and on Aneurysms" published in 1728.
- 10-Corvisart JN: *Essay on the illnesses and organic lesions of the heart and great vessels*. Paris. 1806.
- 11-Morganroth, J., Maron, B. J., Henry, W. L., & Epstein, S. E. (1975). Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Annals of internal medicine*, 82(4), 521-524.
- 12-McMullen, J. R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M. C., Kang, P. M., & Izumo, S. (2003). Phosphoinositide 3-kinase (p110 α) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12355-12360.
- 13-Burgos, J. I., Yeves, A. M., Barrena, J. P., Portiansky, E. L., Vila-Petroff, M. G., & Ennis, I. L. (2017). Nitric oxide and CaMKII: Critical steps in the cardiac contractile response To IGF-1 and swim training. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 112, 16-26.

- 14-Kemi, O. J., Ceci, M., Wisloff, U., Grimaldi, S., Gallo, P., Smith, G. L., ... & Ellingsen, O. (2008). Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *Journal of cellular physiology*, 214(2), 316-321.
- 15-Roberts, C. K., Barnard, R. J., Jasman, A., & Balon, T. W. (1999). Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 277(2), E390-E394.
- 16-Sessa, W. C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J., & Hintze, T. H. (1994). Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circulation research*, 74(2), 349-353.
- 17-Mendelsohn, M. E. (2005). Viagra: now mending hearts. *Nature medicine*, 11(2), 115.
- 18-Matsui, T., Li, L., Wu, J. C., Cook, S. A., Nagoshi, T., Picard, M. H., ... & Rosenzweig, A. (2002). Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22896-22901.
- 19-Van Liere, E. J., & Northup, D. W. (1957). Cardiac hypertrophy produced by exercise in albino and in hooded rats. *Journal of applied physiology*, 11(1), 91-92.
- 20-Oscai, L. B., Mole, P. A., Brei, B., & Holloszy, J. O. (1971). Cardiac growth and respiratory enzyme levels in male rats subjected to a running program. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 220(5), 1238-1241.
- 21-Oscai, L. B., Mole, P. A., & Holloszy, J. O. (1971). Effects of exercise on cardiac weight and mitochondria in male and female rats. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 220(6), 1944-1948.
- 22-Scheuer, J., Penpargkul, S., & Bhan, A. K. (1974). Experimental observations on the effects of physical training upon intrinsic cardiac physiology and biochemistry. *The American journal of cardiology*, 33(6), 744-751.
- 23-Radovits, T., Oláh, A., Lux, Á., Németh, B. T., Hidi, L., Birtalan, E., ... & Merkely, B. (2013). Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305(1), H124-H134.
- 24-Charfeddine, S., Mallek, S., Triki, F., Hammami, R., Abid, D., Abid, L., & Kammoun, S. (2016). Echocardiographic analysis of the left ventricular function in young athletes: a focus on speckle tracking imaging. *The Pan African medical journal*, 25.
- 25-Haykowsky, M. J., & Tomczak, C. R. (2014). LV hypertrophy in resistance or endurance trained athletes: the Morganroth hypothesis is obsolete, most of the time.
- 26-D'Souza, A., Bucchi, A., Johnsen, A. B., Logantha, S. J. R., Monfredi, O., Yanni, J., ... & Dobryznski, H. (2014). Exercise training reduces resting heart

- rate via downregulation of the funny channel HCN4. *Nature communications*, 5, 3775.
- 27-Smith, M. L., Hudson, D. L., Graitzer, H. M., & Raven, P. B. (1989). Exercise training bradycardia: the role of autonomic balance. *Medicine and science in sports and exercise*, 21(1), 40-44.
- 28-Moro, A. S., Okoshi, M. P., Padovani, C. R., & Okoshi, K. (2013). Doppler echocardiography in athletes from different sports. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 19, 187.
- 29-Saks, V., Dzeja, P., Schlattner, U., Vendelin, M., Terzic, A., & Wallimann, T. (2006). Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *The Journal of physiology*, 571(2), 253-273.
- 30-Gleeson, T. T., Mullin, W. J., & Baldwin, K. M. (1983). Cardiovascular responses to treadmill exercise in rats: effects of training. *Journal of Applied Physiology*, 54(3), 789-793.
- 31-Bersohn, M. M., & Scheuer, J. A. M. E. S. (1977). Effects of physical training on end-diastolic volume and myocardial performance of isolated rat hearts. *Circulation Research*, 40(5), 510-516.
- 32-D'andrea, A., Cocchia, R., Riegler, L., Scarafilo, R., Salerno, G., Gravino, R., ... & Pacileo, G. (2010). Left ventricular myocardial velocities and deformation indexes in top-level athletes. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 23(12), 1281-1288.
- 33-Möckel, M., & Störk, T. (1996). Diastolic function in various forms of left ventricular hypertrophy: contribution of active Doppler stress echo. *International journal of sports medicine*, 17(S 3), S184-S190.
- 34-Moore, R. L., Musch, T. I., Yelamarty, R. V., Scaduto Jr, R. C., Semanchick, A. M., Elensky, M. A. R. Y. B. E. T. H., & Cheung, J. Y. (1993). Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 264(5), C1180-C1189.
- 35-Mole, P. A. (1978). Increased contractile potential of papillary muscles from exercise-trained rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 234(4), H421-H425.
- 36-Cazorla, O., Vassort, G., Garnier, D., & Le Guennec, J. Y. (1999). Length modulation of active force in rat cardiac myocytes: is titin the sensor?. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 31(6), 1215-1227.
- 37-Diffie, G. M. (2004). Adaptation of cardiac myocyte contractile properties to exercise training. *Exercise and sport sciences reviews*, 32(3), 112-119.
- 38-Wisløff, U., Loennechen, J. P., Falck, G., Beisvag, V., Currie, S., Smith, G., & Ellingsen, Ø. (2001). Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovascular research*, 50(3), 495-508.
- 39-Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198-205.

- 40-Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., & Ramesh, V. (1999). Shape, size, and distribution of Ca²⁺ release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophysical journal*, 77(3), 1528-1539.
- 41-Beuckelmann, D. J., & Wier, W. G. (1988). Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *The Journal of Physiology*, 405, 233.
- 42-Nabauer, M., Callewaert, G., Cleemann, L., & Morad, M. (1989). Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science*, 244(4906), 800-804.
- 43-Tobacman, L. S. (1996). Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annual Review of Physiology*, 58(1), 447-481.
- 44-Kobayashi, T., & Solaro, R. J. (2005). Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 39-67.
- 45-MacLennan, D. H., Abu-Abed, M., & Kang, C. (2002). Structure–function relationships in Ca²⁺ cycling proteins. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(8), 897-918.
- 46-MacLennan, D. H., & Kranias, E. G. (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(7), 566-577.
- 47-Fujioka, Y., Komeda, M., & Matsuoka, S. (2000). Stoichiometry of Na⁺-Ca²⁺ exchange in inside-out patches excised from guinea-pig ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 523(2), 339-351.
- 48-Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., van Gorp, R., Kovács, T., Gélébart, P., & Enouf, J. (2002). Three Novel Sarco/endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 Isoforms EXPRESSION, REGULATION, AND FUNCTION OF THE MEMBERS OF THE SERCA3 FAMILY. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24442-24452.
- 49-Eisner, D. A., Caldwell, J. L., Kistamás, K., & Trafford, A. W. (2017). Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. *Circulation research*, 121(2), 181-195.
- 50-Opie, L. H., Gevers, W., Nayler, W. G., & Zak, R. (1984). *The heart: Physiology, metabolism, pharmacology, and therapy* (p. 171). Orlando, Florida: Grune & Stratton.
- 51-Kirchberger, M. A., Tada, M., Repke, D. I., & Katz, A. M. (1972). Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulation of calcium uptake by canine cardiac microsomes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 4(6), 673-680.
- 52-Bassani, J. W., Yuan, W. E. I. L. O. N. G., & Bers, D. M. (1995). Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 268(5), C1313-C1319.
- 53-Shannon, T. R., Ginsburg, K. S., & Bers, D. M. (2000). Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration. *Biophysical Journal*, 78(1), 334-343.

- 54-Sitsapesan, R., & Williams, A. J. (1994). Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel by luminal Ca^{2+} . *The Journal of membrane biology*, 137(3), 215-226.
- 55-Lukyanenko, V., Györke, I., & Györke, S. (1996). Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 432(6), 1047-1054.
- 56-Rodriguez, P., Bhogal, M. S., & Colyer, J. (2003). Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *Journal of Biological chemistry*, 278(40), 38593-38600.
- 57-Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2004). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation research*, 94(6), e61-e70.
- 58-Moore, R. L., & Palmer, B. M. (1999). 9 Exercise Training and Cellular Adaptations of Normal and Diseased Hearts. *Exercise and sport sciences reviews*, 27(1), 285-316.
- 59-Laughlin, M. H., Hale, C. C., Novela, L., Gute, D. E. A. N., Hamilton, N., & Ianuzzo, C. D. (1991). Biochemical characterization of exercise-trained porcine myocardium. *Journal of Applied Physiology*, 71(1), 229-235.
- 60-Penpargkul, S. O. M. S. O. N. G., Malhotra, A. S. H. W. A. N. I., Schaible, T. H. O. M. A. S., & Scheuer, J. A. M. E. S. (1980). Cardiac contractile proteins and sarcoplasmic reticulum in hearts of rats trained by running. *Journal of Applied Physiology*, 48(3), 409-413.
- 61-Sordahl, L. A., Asimakis, G. K., Dowell, R. T., & Stone, H. L. (1977). Functions of selected biochemical systems from the exercised-trained dog heart. *Journal of Applied Physiology*, 42(3), 426-431.
- 62-Tate, C., Hamra, M. A. R. Y., Shin, G., Taffet, G., McBRIDE, P. E. R. L. E. Y., & Entman, M. A. R. K. (1993). Canine cardiac sarcoplasmic reticulum is not altered with endurance exercise training. *Medicine and science in sports and exercise*, 25(11), 1246-1257.
- 63-Malhotra, A. S. H. W. A. N. I., Penpargkul, S. O. M. S. O. N. G., Schaible, T. H. O. M. A. S., & Scheuer, J. A. M. E. S. (1981). Contractile proteins and sarcoplasmic reticulum in physiologic cardiac hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 241(2), H263-H267.
- 64-Pagani, E. D., & Solaro, R. J. (1984). Coordination of cardiac myofibrillar and sarcotubular activities in rats exercised by swimming. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 247(6), H909-H915.
- 65-Penpargkul, S., Repke, D. I., Katz, A. M., & Scheuer, J. A. M. E. S. (1977). Effect of physical training on calcium transport by rat cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circulation Research*, 40(2), 134-138.
- 66-Kemi, O. J., Ceci, M., Condorelli, G., Smith, G. L., & Wisloff, U. (2008). Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase function is increased by aerobic interval training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 15(2), 145-148.

- 67-Hass, E. E., Cope, J. T., Stauffer, B., Blauth, J., Semanchick, A. M., & Moore, R. L. (1992). Effect of endurance training and hypertension on rat cardiac ryanodine receptor number. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 24(5), S20.
- 68-Saborido, A., Molano, F., Moro, G., & Megias, A. (1995). Regulation of dihydropyridine receptor levels in skeletal and cardiac muscle by exercise training. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 429(3), 364-369.
- 69-Tibbits, G. F., Kashihara, H. A. R. U. Y. O., & O'Reilly, K. E. V. I. N. (1989). Na⁺-Ca²⁺ exchange in cardiac sarcolemma: modulation of Ca²⁺ affinity by exercise. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 256(3), C638-C643.
- 70-Laughlin, M. H., Schaefer, M. E., & Sturek, M. (1992). Effect of exercise training on intracellular free Ca²⁺ transients in ventricular myocytes of rats. *Journal of Applied Physiology*, 73(4), 1441-1448.
- 71-Bernardo, B. C., & McMullen, J. R. (2016). Molecular aspects of exercise-induced cardiac remodeling. *Cardiology clinics*, 34(4), 515-530.
- 72-Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L., & McMullen, J. R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & therapeutics*, 128(1), 191-227.
- 73-Tibbits, G. F., Nagatomo, T., Sasaki, M., & Barnard, R. J. (1981). Cardiac sarcolemma: compositional adaptation to exercise. *Science*, 213(4513), 1271-1273.
- 74-Moreno, C., Hermosilla, T., Morales, D., Encina, M., Torres-Díaz, L., Díaz, P., ... & Varela, D. (2015). Ca^vβ₂ transcription start site variants modulate calcium handling in newborn rat cardiomyocytes. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 467(12), 2473-2484.
- 75-Pavlik, G., Major, Z., Csajági, E., Jeserich, M., & Kneffel, Z. (2013). The athlete's heart Part II Influencing factors on the athlete's heart: Types of sports and age. *Acta Physiologica Hungarica*, 100(1), 1-27.
- 76-Pearson, A. C., Schiff, M., Mrosek, D., Labovitz, A. J., & Williams, G. A. (1986). Left ventricular diastolic function in weight lifters. *American Journal of Cardiology*, 58(13), 1254-1259.
- 77-Pluim, B. M., Zwinderman, A. H., van der Laarse, A., & van der Wall, E. E. (2000). The athlete's heart: a meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*, 101(3), 336-344.
- 78-George, K. P., Batterham, A. M., & Jones, B. (1998). The impact of scalar variable and process on athlete-control comparisons of cardiac dimensions. *Medicine and science in sports and exercise*, 30(6), 824-830.
- 79-Haykowsky, M. J., Quinney, H. A., Gillis, R., & Thompson, C. R. (2000). Left ventricular morphology in junior and master resistance trained athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(2), 349-352.
- 80-Barbier, J., Ville, N., Kervio, G., Walther, G., & Carré, F. (2006). Sports-specific features of athlete's heart and their relation to

- echocardiographic parameters. *Herz Kardiovaskuläre Erkrankungen*, 31(6), 531-543.
- 81-Pavlik, G. (2002). Echocardiographic characteristics of elite athletes. XXVII. In *FIMS World Congress of Sports Medicine. Monduzzi Editor, Budapest* (pp. 169-173).
- 82-Pavlik, G., Olexó, Z., Osvath, P., Sido, Z., & Frenkl, R. (2001). Echocardiographic characteristics of male athletes of different age. *British Journal of Sports Medicine*, 35(2), 95-99.
- 83-Arbab-Zadeh, A., Perhonen, M., Howden, E., Peshock, R. M., Zhang, R., Adams-Huet, B., ... & Levine, B. D. (2014). Cardiac remodeling in response to 1 year of intensive endurance training. *Circulation*, CIRCULATIONAHA-114.
- 84-Wang, Y., Wisloff, U., & Kemi, O. J. (2010). Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. *Physiological research*, 59(5), 633.
- 85-Diffie, G. M., & Nagle, D. F. (2003). Regional differences in effects of exercise training on contractile and biochemical properties of rat cardiac myocytes. *Journal of Applied Physiology*, 95(1), 35-42.
- 86-Fenning, A., Harrison, G., Dwyer, D., Rose'Meyer, R., & Brown, L. (2003). Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. In *Biochemistry of Hypertrophy and Heart Failure* (pp. 51-59). Springer, Boston, MA.
- 87-Wisløff, U., Helgerud, J., Kemi, O. J., & Ellingsen, Ø. (2001). Intensity-controlled treadmill running in rats: $\dot{V}O_2$ max and cardiac hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 280(3), H1301-H1310.
- 88-Natali, A. J., Turner, D. L., Harrison, S. M., & White, E. (2001). Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *Journal of Experimental Biology*, 204(6), 1191-1199.
- 89-Iemitsu, M., Miyauchi, T., Maeda, S., Sakai, S., Fujii, N., Miyazaki, H., ... & Yamaguchi, I. (2003). Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertension Research*, 26(10), 829-837.
- 90-Medeiros, A., Oliveira, E. M. D., Gianolla, R., Casarini, D. E., Negrão, C. E., & Brum, P. C. (2004). Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(12), 1909-1917.
- 91-Kemi, O. J., Loennechen, J. P., Wisløff, U., & Ellingsen, Ø. (2002). Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *Journal of applied physiology*, 93(4), 1301-1309.
- 92-Evangelista, F. S., Brum, P. C., & Krieger, J. E. (2003). Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(12), 1751-1759.
- 93-White, F. C., McKirnan, M. D., Breisch, E. A., Guth, B. D., Liu, Y. M., & Bloor, C. M. (1987). Adaptation of the left ventricle to exercise-induced hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, 62(3), 1097-1110.

- 94-Carroll, J. F., & Kyser, C. K. (2002). Exercise training in obesity lowers blood pressure independent of weight change. *Medicine and science in sports and exercise*, 34(4), 596-601.
- 95-Medeiros, A., Oliveira, E. M. D., Gianolla, R., Casarini, D. E., Negrão, C. E., & Brum, P. C. (2004). Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(12), 1909-1917.
- 96-Yin, F. C., Spurgeon, H. A., Rakusan, K. A. R. E. L., Weisfeldt, M. L., & Lakatta, E. G. (1982). Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 243(6), H941-H947.
- 97-Toffolo, R. L., & Ianuzzo, C. D. (1994). Myofibrillar adaptations during cardiac hypertrophy. *Molecular and cellular biochemistry*, 131(2), 141-149.
- 98-Levy, W. C., Cerqueira, M. D., Abrass, I. B., Schwartz, R. S., & Stratton, J. R. (1993). Endurance exercise training augments diastolic filling at rest and during exercise in healthy young and older men. *Circulation*, 88(1), 116-126.
- 99-Kemi, O. J., Haram, P. M., Høydal, M. A., Wisløff, U., & Ellingsen, Ø. (2013). Exercise training and losartan improve endothelial function in heart failure rats by different mechanisms. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 47(3), 160-167.
- 100- Wang, S., Ma, J. Z., Zhu, S. S., Xu, D. J., Zou, J. G., & Cao, K. J. (2008). Swimming training can affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *European journal of applied physiology*, 104(3), 549-555.
- 101- Kirchberger, M. A., Tada, M., Repke, D. I., & Katz, A. M. (1972). Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulation of calcium uptake by canine cardiac microsomes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 4(6), 673-680.
- 102- Maier, L. S., & Bers, D. M. (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(8), 919-939.
- 103- Picht, E., DeSantiago, J., Huke, S., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., & Bers, D. M. (2007). CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits frequency-dependent acceleration of relaxation and Ca²⁺ current facilitation. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42(1), 196-205.
- 104- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., & Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological reviews*, 74(3), 595-636.
- 105- Pogwizd, S. M., & Bers, D. M. (2002). Calcium cycling in heart failure: the arrhythmia connection. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 13(1), 88-91.
- 106- Hullin, R., Matthes, J., Von Vietinghoff, S., Bodi, I., Rubio, M., D'Souza, K., ... & Schmitteckert, E. (2007). Increased Expression of the Auxiliary β_2 -subunit of Ventricular L-type Ca²⁺ Channels Leads to Single-Channel Activity Characteristic of Heart Failure.

- 107- Hullin, R., Khan, I. F. Y., Wirtz, S., Mohacsi, P., Varadi, G., Schwartz, A., & Herzig, S. (2003). Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. *Journal of Biological Chemistry*.
- 108- MacGowan, G. A., Kirk, J. A., Evans, C., & Shroff, S. G. (2006). Pressure-calcium relationships in perfused mouse hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(6), H2614-H2624.
- 109- Zhao, Z. H., Jin, C. L., Jang, J. H., Wu, Y. N., Kim, S. J., Jin, H. H., ... & Zhang, Y. H. (2016). Assessment of myofilament Ca²⁺ sensitivity underlying cardiac excitation–contraction coupling. *J Vis Exp*, 114.
- 110- Lyon, A. R., MacLeod, K. T., Zhang, Y., Garcia, E., Kanda, G. K., Korchev, Y. E., ... & Gorelik, J. (2009). Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16), 6854-6859.
- 111- Horiuchi-Hirose, M., Kashihara, T., Nakada, T., Kurebayashi, N., Shimojo, H., Shibasaki, T., ... & Sakurai, T. (2010). Decrease in the density of t-tubular L-type Ca²⁺ channel currents in failing ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300(3), H978-H988.
- 112- Beuckelmann, D. J., Näbauer, M., & Erdmann, E. (1992). Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation*, 85(3), 1046-1055.
- 113- Fentzke, R. C., Korcarz, C. E., Lang, R. M., Lin, H., & Leiden, J. M. (1998). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *The Journal of clinical investigation*, 101(11), 2415-2426.
- 114- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., & Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*, 386(6627), 855.
- 115- Pugazhenthii, S., Boras, T., O'Connor, D., Meintzer, M. K., Heidenreich, K. A., & Reusch, J. E. B. (1999). Insulin-like Growth Factor I-mediated Activation of the Transcription Factor cAMP Response Element-binding Protein in PC12 Cells INVOLVEMENT OF p38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE-MEDIATED PATHWAY. *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 2829-2837.
- 116- Kuster, D. W., Merkus, D., Blonden, L. A., Kremer, A., van IJcken, W. F., Verhoeven, A. J., & Duncker, D. J. (2014). Gene reprogramming in exercise-induced cardiac hypertrophy in swine: a transcriptional genomics approach. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 77, 168-174.
- 117- Watson, P. A., Reusch, J. E., McCune, S. A., Leinwand, L. A., Luckey, S. W., Konhilas, J. P., ... & Moore, R. L. (2007). Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 293(1), H246-H259.