



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **Estudi de l'exercici físic intens i la síndrome de l'apnea del son com a factors de risc emergents per a patologia cardiovascular. Caracterització en models animals**

Cira Rubies Espinalt



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Estudi de l'exercici físic intens i la síndrome  
de l'apnea del son com a factors de risc  
emergents per a patologia cardiovascular.  
Caracterització en models animals.**

Tesi presentada per

Cira Rubies Espinalt

Per obtenir el títol de doctora per la Universitat de Barcelona

**Codirigida per:**

Eduard Guasch Casany

Montserrat Batlle Perales

Programa de doctorat Medicina

Universitat de Barcelona

2017



Health Universitat de  
Barcelona  
Campus

**B:KC** Barcelona  
Knowledge  
Campus



<<Tot excés és a la naturalesa contrari>>

*-Hipòcrates (460 a.de C.- 370 a.de C.)*

Als meus pares.  
A la meva germana.  
Al Xavi.



# Índex general

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
1.1. EL SISTEMA CARDIOVASCULAR	1
1.1.1. Anatomia i fisiologia general	1
1.2. PATOLOGIA CARDIOVASCULAR	25
1.2.1. Remodelat patològic vascular	25
1.2.2. Remodelat patològic cardíac	30
1.3. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR TRADICIONALS	38
1.4. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR EMERGENTS	40
1.4.1. Beneficis generals de l'exercici físic	40
1.4.2. Adaptació fisiològica a l'exercici de resistència	44
1.4.3. Adaptació patològica a l'exercici de resistència	51
1.4.4. Característiques generals de la SAOS	55
1.4.5. Efectes cardiovasculars de la SAOS	56
1.4.6. SAOS i malaltia cardiovascular	58
1.4.7. Teràpia amb cèl·lules mare i SAOS	60
<b>2. OBJECTIU GENERAL</b>	<b>63</b>
2.1. OBJECTIU GENERAL	65
<b>ESTUDI 1: ESTUDI DEL REMODELAT VASCULAR</b>	<b>67</b>
<b>3. SUB-ESTUDI 1.1</b>	<b>69</b>
3.1. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	71
3.2. METODOLOGIA	72
3.2.1. Protocol d'entrenament	72
3.2.2. Grups experimentals	73
3.2.3. Eutanàsia i recollida de mostres	73
3.2.4. Avaluació de l'hipertròfia cardíaca	74
3.2.5. Determinació de la pressió sanguínia i freqüència cardíaca	75
3.2.6. Estudi ecocardiogràfic	75
3.2.7. Avaluació de la rigidesa aòrtica	76
3.2.8. Estudi morfomètric de l'aorta	76
3.2.9. Estudi de les làmines elàstiques de l'aorta	77
3.2.10. Quantificació de la fibrosi a l'aorta	77
3.2.11. Quantificació de la producció de superòxid a l'aorta	78
3.2.12. Quantificació dels nivells de proteïna per Western Blot a l'aorta	79
3.2.13. Quantificació de l'expressió de miRNA a l'aorta	81
3.2.14. Estudi de reactivitat vascular de l'aorta	83
3.2.15. Estudi morfomètric de vasos intramiocàrdics	86
3.2.16. Anàlisi estadístic	87
3.3. RESULTATS	88
3.3.1. Adaptació fisiològica a l'exercici	88
3.3.2. Remodelat estructural de l'aorta	89
3.3.3. Remodelat funcional de l'aorta	98

3.3.4. Remodelat estructural de la caròtida	103
3.3.5. Remodelat estructural de vasos intramiocàrdics	104
3.4. CONCLUSIONS	106
<b>4. SUB-ESTUDI 1.2</b>	<b>107</b>
4.1. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	109
4.2. METODOLOGIA	110
4.2.1. Model experimental	110
4.2.2. Infusió de cèl·lules mare mesenquimals	111
4.2.3. Eutanàsia i recollida de mostres	112
4.2.4. Aïllament de proteïna i anàlisi mitjançant <i>Western Blot</i>	113
4.2.5. Anàlisi morfològic de l'aorta	114
4.2.6. Quantificació de la fibrosi aòrtica	114
4.2.7. Detecció d'anió superòxid	114
4.2.8. Anàlisi estadístic	115
4.3. RESULTATS	116
4.3.1. Remodelat estructural de l'aorta induït pel SAOS	116
4.3.2. Mecanismes de remodelat vascular induït per la SAOS	117
4.3.3. Efecte de la infusió de cèl·lules mare mesenquimals	119
4.4. CONCLUSIONS	122
<b>ESTUDI 2: ESTUDI DEL REMODELAT CARDÍAC</b>	<b>123</b>
<b>5. SUB-ESTUDI 2.1</b>	<b>125</b>
5.1. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	127
5.2. METODOLOGIA	128
5.2.1. Model animal	128
5.2.2. Protocol d'entrenament	128
5.2.3. Grups experimentals	128
5.2.4. Administració del fàrmac	128
5.2.5. Eutanàsia i recollida de mostres	129
5.2.6. Assaig ELISA de GMPc	129
5.2.7. Avaluació de la hipertrofia cardíaca	129
5.2.8. Quantificació de la fibrosi auricular	130
5.2.9. Aïllament d'ARNm	130
5.2.10. Anàlisi estadístic	131
5.3. RESULTATS	132
5.3.1. Nivells de GMPc en plasma	132
5.3.2. Hipertrofia cardíaca	132
5.3.3. Fibrosi auricular	133
5.3.4. Expressió d'ARNm de marcadors profibròtics	134
5.4. CONCLUSIONS	136
<b>6. SUB-ESTUDI 2.2</b>	<b>137</b>

6.1. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	139
6.2. METODOLOGIA	140
6.2.1. Model experimental	140
6.2.2. Infusió de cèl·lules mare mesenquimals	140
6.2.3. Grups experimentals	140
6.2.4. Recollida de mostres i aïllament d'ARN	140
6.2.5. Reacció de retrotranscripció i PCR a temps real	141
6.2.6. Extracció de proteïna	142
6.2.7. Western Blot de MMP-2	142
6.2.8. Assaig en plasma ELISA	142
6.2.9. Immunofluorescència de CD90	143
6.2.10. Hipertròfia cardíaca	143
6.2.11. Quantificació de fibrosi miocàrdica	144
6.2.12. Anàlisi estadístic	144
6.3. RESULTATS	145
6.3.1. Efecte de la SAOS sobre la fibrosi auricular	145
6.3.2. Efecte de les CMMs sobre la fibrosi auricular induïda per la SAOS	149
6.4. CONCLUSIONS	153
<b>7. DISCUSSIÓ</b>	<b>155</b>
7.1. PATOLOGIA VASCULAR I EXERCICI INTENS	157
7.1.1. El model animal reproduceix diferents dosis d'exercici	157
7.1.2. Efectes associats a l'exercici	158
7.1.3. Efectes associats a la dosi d'exercici	159
7.1.4. Relació en forma de "U" entre la dosi d'exercici i el risc cardiovascular	172
7.2. PATOLOGIA VASCULAR I SAOS	173
7.2.1. Model animal crònic de SAOS: avantatges i limitacions	173
7.2.2. Canvis estructurals de l'aorta induïts per la SAOS	174
7.2.3. Mecanismes potencials per l'associació entre SAOS i remodelat aòrtic	176
7.2.4. Potencial efecte protector del remodelat aòrtic per les CMMs	178
7.2.5. Futurs reptes de la teràpia amb CMMs	180
7.3. PATOLOGIA CARDÍACA I EXERCICI INTENS	181
7.3.1. Remodelat cardíac associat a l'exercici intens	181
7.3.2. Ús del sildenafil per a la prevenció del remodelat cardíac	184
7.4. PATOLOGIA CARDÍACA I SAOS	187
7.4.1. Models animals de SAOS i arritmogènesi	187
7.4.2. Remodelat profibròtic auricular associat a la SAOS	188
7.4.3. Ús de CMMs per prevenir el remodelat profibròtic auricular	189
<b>8. CONCLUSIONS GLOBALES</b>	<b>157</b>
<b>9. ANNEX</b>	<b>197</b>
<b>10 .BIBLIOGRAFIA</b>	<b>213</b>



## Índex de figures

<b>Figura 1.</b> Diagrama de l'anatomia interna del cor.	2
<b>Figura 2.</b> Esquema de les capes que conformen el teixit cardíac.	3
<b>Figura 3.</b> Esquema de l'organització de la cèl·lula muscular cardíaca i del sarcòmer.	4
<b>Figura 4.</b> Fases del potencial d'acció (PAC) cardíac i principals corrents iòniques.	7
<b>Figura 5.</b> Imatge esquemàtica del sistema de conducció elèctrica del cor.	8
<b>Figura 6.</b> Electrocardiograma (ECG). Corba ECG corresponent a un batec cardíac.	9
<b>Figura 7.</b> Estructura del cor i sentit del flux sanguini a través de les cavitats cardíques i de les vàlvules cardíques.	10
<b>Figura 8.</b> Corba de <i>Frank-Starling</i> .	12
<b>Figura 9.</b> Esquema de la paret vascular.	13
<b>Figura 10.</b> Anatomia i morfologia de l'artèria elàstica aorta.	17
<b>Figura 11.</b> Regulació de la concentració de calci intracel·lular en la cèl·lula muscular llisa i contracció depenent d'ATPasa.	20
<b>Figura 12.</b> Factors vasoactius derivats de l'endoteli.	22
<b>Figura 13.</b> Resposta típica enfront una lesió vascular.	27
<b>Figura 14.</b> Classificació de la hipertrofia cardíaca.	32
<b>Figura 15.</b> Comunicació cel·lular entre miòcits fibroblasts.	34
<b>Figura 16.</b> Dos dels primers ECG registrats en pacients amb FA.	35
<b>Figura 17.</b> Factors promotors de FA.	38
<b>Figura 18.</b> Història natural de les MCV i classificació dels factors de risc.	39
<b>Figura 19.</b> Beneficis sobre la salut de la pràctica d'activitat física.	41
<b>Figura 20.</b> Adaptació fisiològica cardiovascular a l'exercici de resistència.	45
<b>Figura 21.</b> Esquema de la dosi-resposta de l'exercici des de dosis baixes/moderades a dosis altes i possibles repercussions cardiovasculars associades a nivells excessius d'exercici.	52
<b>Figura 22.</b> L'apnea obstructiva del son.	56
<b>Figura 23.</b> Mecanismes de dany vascular en la SAOS.	61
<b>Figura 24.</b> Cinta rodant amb cinc carrils utilitzada pel protocol d'entrenament.	73
<b>Figura 25.</b> Esquema de les tècniques usades i les mostres recollides per a l'estudi de remodelat vascular associat a l'exercici.	74
<b>Figura 26.</b> Anàlisi morfomètric de l'aorta toràcica.	76
<b>Figura 27.</b> Tècnica de dihidroetidi (DHE).	79
<b>Figura 28.</b> Bany d'òrgans i miògraf per l'estudi de reactivitat vascular.	85
<b>Figura 29.</b> Esquema representatiu de l'anàlisi morfomètric dels vasos intramiocàrdics.	86
<b>Figura 30.</b> Pesos dels animals i hipertrofia cardíaca associada a l'exercici.	88
<b>Figura 31.</b> Canvis en la freqüència cardíaca associats a l'exercici.	89
<b>Figura 32.</b> Estudi morfomètric de l'aorta.	90
<b>Figura 33.</b> Estudi ecocardiogràfic de l'aorta ascendent.	91
<b>Figura 34.</b> Estudi de les làmines elàstiques de l'aorta.	92
<b>Figura 35.</b> Fibrosi de la túnica mitjana de l'aorta associada a l'exercici.	93
<b>Figura 36.</b> Anàlisi dels nivells de proteïna per <i>Western Blot</i> .	93
<b>Figura 37.</b> Expressió de miARNs en mostres d'aorta.	94
<b>Figura 38.</b> Array d'expressió de miARNs en mostres d'aorta.	95
<b>Figura 39.</b> Validació de l'expressió de miARNs per RT-PCR.	96
<b>Figura 40.</b> Xarxa d'interaccions entre miARNs i gens diana.	97
<b>Figura 41.</b> Xarxa d'interaccions entre els miARNs i les vies de senyalització.	98
<b>Figura 42.</b> Anàlisi dels nivells d'estrès oxidatiu amb dihidroetidi (DHE).	99
<b>Figura 43.</b> Corbes de dosi-resposta al Carbacol ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$ M) en anells aòrtics.	100
<b>Figura 44.</b> Corbes de dosi-resposta a la Fenilefrina ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$ M) en anells aòrtics.	101
<b>Figura 45.</b> Estudi hemodinàmic <i>in vivo</i> .	102
<b>Figura 46.</b> Estudi ecocardiogràfic i anàlisi de rigidisa aòrtica.	103
<b>Figura 47.</b> Remodelat estructural de la caròtida esquerra induït per l'exercici físic.	104
<b>Figura 48.</b> Estudi morfomètric de vasos intramiocàrdics.	105

<b>Figura 49.</b> Esquema del sistema dissenyat per a l'aplicació del model animal d'obstruccions aèries en rata.	111
<b>Figura 50.</b> Disseny experimental per avaluar l'efecte de la infusió de CMMs en el model de SAOS.	112
<b>Figura 51.</b> Remodelat morfològic de l'aorta induït pel SAOS.	116
<b>Figura 52.</b> Anàlisi de la fibrosi de l'aorta.	117
<b>Figura 53.</b> Producció de superòxid a l'aorta associada al SAOS.	118
<b>Figura 54.</b> Avaluació de marcadors de remodelat vascular a l'aorta.	119
<b>Figura 55.</b> Les cèl·lules mare mesenquimals normalitzen la dilatació aòrtica induïda pel SAOS.	120
<b>Figura 56.</b> Les cèl·lules mare mesenquimals atenuen la producció de superòxid induïda pel SAOS.	120
<b>Figura 57.</b> Les cèl·lules mare mesenquimals atenuen els nivells de marcadors de remodelat vascular a l'aorta.	121
<b>Figura 59.</b> Esquema de les seccions de cor analitzades.	130
<b>Figura 60.</b> Quantificació de la concentració de GMPc amb ELISA.	132
<b>Figura 61.</b> Avaluació de la hipertròfia ventricular.	133
<b>Figura 62.</b> Quantificació de la fibrosi auricular.	134
<b>Figura 63.</b> Expressió d'ARNm dels marcadors fibròtics TGF- $\beta$ 1 i ECA en ambdues aurícules.	135
<b>Figura 64.</b> Estudi de la fibrosi miocàrdica de les rates Sham i SAOS.	146
<b>Figura 65.</b> Estudi dels mecanismes implicats en la fibrosi miocàrdica.	147
<b>Figura 66.</b> Expressió d'ARNm en les quatre cavitats cardíques.	148
<b>Figura 67.</b> Correlació entre els nivells plasmàtics d'IL-1 $\beta$ i la fibrosi miocàrdica a nivell auricular (A) i al ventricle esquerre (B).	148
<b>Figura 68.</b> Estudi de la fibrosi miocàrdica en rates Sham+S i SAOS+CMM.	149
<b>Figura 69.</b> Immunofluorescència de CD90 en mostres de miocardi.	150
<b>Figura 70.</b> Estudi dels mecanismes implicats en la fibrosi en rates Sham+S i SAOS+CMM.	151
<b>Figura 71.</b> Expressió d'ARNm en els grups Sham+S i SAOS+CMM.	152
<b>Figura 72.</b> Esquema del remodelat vascular de l'aorta induït per l'exercici en el nostre model animal i els possibles mecanismes implicats.	169
<b>Figura 73.</b> Esquema del remodelat vascular de l'artèria caròtida i dels vasos intramiocàrdics observat en el nostre model animal i els possibles mecanismes implicats.	172
<b>Figura 74.</b> Esquema del remodelat vascular de l'aorta observat induït per la SAOS en el nostre model animal i els possibles mecanismes implicats.	180
<b>Figura 75.</b> Fisiopatologia proposada de la fibrosi auricular induïda per la SAOS i mecanisme d'acció de les CMM.	191

## Índex de taules

<b>Taula 1.</b> Diferents activitats físiques classificades segons la seva intensitat.	43
<b>Taula 2.</b> Sondes de miARN utilitzades per a la RT-PCR.	83
<b>Taula 3.</b> miARNs diferencialment expressats entre els grups experimentals.	94
<b>Taula 4.</b> Pes dels animals (g), pes del cor (g) i ràtio del pes de cor normalitzat pel pes corporal a les 16 setmanes.	133
<b>Taula 5.</b> Sondes TaqMan de gens únics utilitzades en la PCR-RT.	141
<b>Taula 6.</b> Pes corporal, pes del cor i ràtio del pes del cor normalitzada amb el pes corporal.	145
<b>Taula 7.</b> Gruixos ( $\mu\text{m}$ ) de les parts lliures del ventricle esquerre (VE), del ventricle dret (VD) i del septe interventricular (SIV) normalitzats pel pes.	145
<b>Taula 8.</b> Pes corporal (g), pes del cor (g) i ràtio del pes del cor normalitzada amb el pes corporal (g).	149

## **Llistat d'abreviatures**

AA: Aneurisma d'aorta

AD: Aurícula dreta

AE: Aurícula esquerra

Ang-II: Angiotensina II

ARNm: Àcid ribonucleic missatger

ATP: Adenina trifosfat

Cch: Carbacol

CE: Cèl·lula endotelial

CPAP: Pressió positiva continua en la via aèria

ECA-1: Enzim convertidor d'angiotensina 1

ECG: Electrocardiograma

EDHF: Factor hiperpolaritzant endotelial

EEM: Error estàndard de la mitja

EMC: Matriu extracel·lular

eNOS: Sintasa d'òxid nítric endotelial

ET-1: Endotelina 1

FA: Fibril·lació auricular

FE: Fenilefrina

FC: Freqüència cardíaca

GC: Guanilil ciclasa

HDL: Lipoproteïna d'alta densitat

IAM: Infart agut de miocardi

ICC: Insuficiència cardíaca crònica

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10: Interleuquina 1 $\beta$ , 6, 10

IMC: Índex de massa corporal

LDL: Lipoproteïna de baixa densitat

OMS: Organització Mundial de la Salut

NO: Òxid nítric

PGI<sub>2</sub>: Prostaglandina I<sub>2</sub>

MCV: Malaltia cardiovascular

MET: Equivalent metabòlic de tasca

NE: Norepinefrina

NS: Node sisusal

PA: Pressió arterial

PAC: Potencial d'acció cardíac

PAM: Pressió arterial mitjana

Pas: Pressió arterial sistòlica

Pad: Pressió arterial diastòlica

PP: Pressió del pols

PKG: Proteïna Quinasa G

PKA: Proteïna Quinasa A

ROS: Espècies reactives de l'oxigen

RT-PCR: Reacció de la polimerasa en cadena a temps real

SAOS: Síndrome de l'apnea obstructiva del son

SIV: Septe interventricular

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TGF- $\beta$ 1: Factor de creixement transformador beta 1

TxA<sub>2</sub>: Tromboxà A<sub>2</sub>

TSR: Transtorns de la son relacionats amb la respiració

VD: Ventricle dret

VE: Ventricle esquerre

VO<sub>2</sub>: Consum d'oxigen

VSMC: Cèl·lula muscular llisa vascular

## Pròleg

La present tesi Doctoral ha estat realitzada dins del programa de Medicina de la Universitat de Barcelona. La Comissió de Doctorat de la Facultat de Medicina ha avaluat i acceptat aquesta memòria per a la seva publicació i presentació com a tesi doctoral. Seguint la normativa vigent, la present tesi està redactada i compleix amb els criteris de presentació en el format clàssic. Dels resultats exposats se n'ha derivat un article original publicat en una revista indexada situada dins dels dos primers quartils de l'àrea de coneixement:

*Ramos P, Rubies C, Torres M, Batlle M, Farre R, Brugada J, et al. Atrial fibrosis in a chronic murine model of obstructive sleep apnea: mechanisms and prevention by mesenchymal stem cells. Respir Res. 2014;15:54.*

La resta de resultats presentats en la present tesi es troben en fase de correccions prèvia a la seva futura publicació, en la qual la doctoranda constarà com a primera autora. Aquests resultats, tot i no estar acceptats per a la seva publicació, han sigut presentats per la doctoranda en diversos congressos tant d'àmbit nacional com internacional: *European Society of Cardiology Congress (2016)*, *Frontiers in Cardiovascular Biology (2016)*, *American Heart Association's Scientific Sessions (2015)*, *Congreso de las enfermedades cardiovasculares de la SEC (2015)*, *Heart Rhythm Society's 34th Annual Scientific Sessions (2013)*.

La realització d'aquesta tesi ha estat possible gràcies al suport econòmic de la xarxa d'Investigació Cardiovascular HERACLES (2010-2011) i del fons europeu *European Union's Horizon 2020 (2015-2017)*. A més, durant el període 2011-2015, la doctoranda va obtenir una beca doctoral *Formación en Investigación en Salud (PFIS)* del *Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad)*.

L'estructura d'aquesta tesi consta d'una introducció amb la base teòrica més rellevant relacionada amb l'àrea temàtica de la memòria. A continuació es presenta l'objectiu general i els objectius principals de la tesi, la qual s'ha dividit en dos estudis: l'estudi 1 i l'estudi 2. Cada estudi s'ha dividit dos sub-estudis. Dins de cada sub-estudi es presenta la hipòtesi de treball, els objectius, la metodologia, els resultats i les conclusions. A continuació, es discuteixen els dos estudis i es presenten les conclusions globals. Seguidament es presenta l'annex en el qual s'adjunta l'article publicat l'any 2014, del qual la doctoranda n'és la segona autora. A la darrera part de la tesi hi consta la bibliografia emprada al llarg de la memòria.



# **1. INTRODUCCIÓ**





## **1.1. EL SISTEMA CARDIOVASCULAR**

### **1.1.1. Anatomia i fisiologia general**

El sistema cardiovascular o aparell circulatori s'encarrega d'assegurar la circulació de sang i de limfa a tot l'organisme. Està format per un òrgan central d'impulsió/recepció, el cor, i per un conjunt de vies de conducció que varien segons la seva estructura i funció: les artèries, les venes, els vasos capil·lars i els vasos limfàtics.

#### **1.1.1.1. Estructura i funció del cor**

##### **Morfologia externa**

El cor es troba situat a l'interior de la cavitat toràcica, a l'espai situat entre els dos pulmons, el mediastí. La forma del cor generalment es descriu com una piràmide triangular, amb una base superior i un vèrtex inferior i esquerre (àpex), de manera que l'eix no es disposa verticalment, sinó que segueix una trajectòria obliqua de darrera cap endavant, de dreta a esquerra i de dalt a baix. Així doncs, el cor està conformat per una base, un vèrtex i dues cares (anterior i posterior).

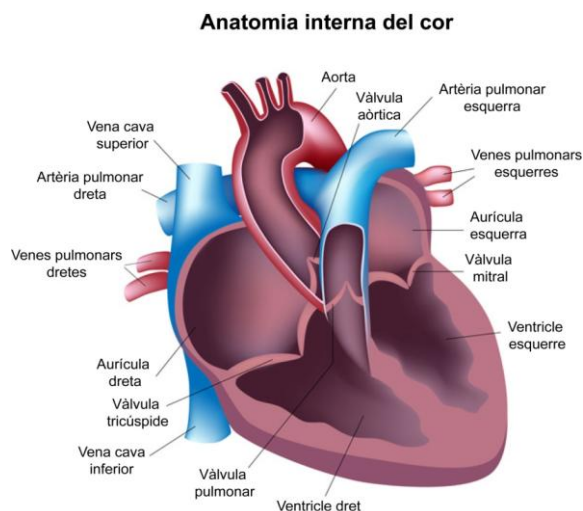
##### **Cavitats cardíques**

El cor s'encarrega de recollir i impulsar la sang a tot l'organisme, amb la finalitat d'aportar als teixits un subministrament constant de nutrients vitals alhora que facilitar l'excreció de residus. Per tal de portar a terme aquesta funció de bombeig, el cor disposa de dues cavitats de recepció, les aurícules, i dues cavitats d'impulsió, els ventricles. Les cavitats es troben separades entre si per envans de separació que permeten independitzar les quatre cavitats entre elles. Aquests envans s'anomenen, segons la seva posició anatòmica: septe interauricular (separa les dues aurícules), septe interventricular (separa els dos ventricles) i septe auriculoventricular (separa aurícula i ventricle). Funcionalment, el cor es troba dividit en dues meitats, l'esquerra i la dreta, cadascuna de les quals conté dues cavitats: una aurícula i un ventricle, separades entre elles pel septe auriculoventricular i amb una vàlvula que les connecta (Figura 1).

Les aurícules són cavitats de recepció de sang durant la fase de distensió del cor o diàstole, i es troben comunicades amb venes de calibre gran (vena cava superior i inferior a l'aurícula dreta i quatre venes pulmonars a l'aurícula esquerra) i amb el ventricle contigu a través de vàlvules auriculoventriculars (vàlvula tricúspide a l'aurícula dreta i vàlvula mitral a l'aurícula esquerra). Aquestes vàlvules es sustenten per un aparell muscular de fixació específic (músculs papil·lars). Les aurícules són cavitats de parets fines, amb la presència de prolongacions diverticulars (orelletes auriculars) que es caracteritzen per un

augment d'espessor de la capa muscular i per la presència de relleus musculars al seu interior, els músculs pectinats.

Els ventricles són cavitats irregulars, plenes de relleus musculars que impulsen la sang cap a l'exterior del cor durant la fase de contracció o sístole. Comuniquen amb les grans artèries que s'originen al cor a través de dos orificis els quals disposen de vàlvules denominades vàlvules sigmoidees o semilunars (vàlvula pulmonar a la cavitat dreta i vàlvula aòrtica a la cavitat esquerra), que permeten la sortida de sang, o n'impedeixen el seu reflux cap al ventricle depenent del moment de la contracció cardíaca (Figura 1). La connexió amb les aurícules, les vàlvules auriculoventriculars, s'oposen al retorn del flux sanguini, imposant un únic sentit. Cal remarcar però que ambdós ventricles presenten característiques úniques que els diferencien entre ells: el ventricle dret (VD) és una cavitat piramidal amb una paret anterior relativament prima, en canvi el ventricle esquerre (VE) presenta unes parets més gruixudes, de mida més gran i amb una forma cònica (pràcticament circular en un tall transversal).



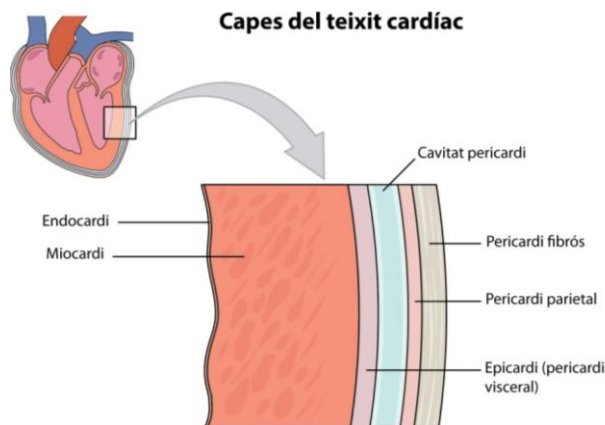
**Figura 1. Diagrama de l'anatomia interna del cor.**  
(Adaptat de referència <sup>1</sup>).

### 1.1.1.2. Anatomia del múscul cardíac

L'estructura del cor està formada per un teixit muscular especialitzat, el múscul estriat cardíac, que té la capacitat de contraure's espontàniament i de forma periòdica permetent el manteniment de la funció cardíaca de manera continuada.

El múscul cardíac es compon de varies capes: l'endocardi, la capa més interna que recobreix l'interior de les cavitats cardíques; el miocardi, la capa intermèdia que es correspon amb el gruix del múscul cardíac; l'epicardi, la capa superficial que recobreix el miocardi, i el pericardi, un teixit serós que separa i aïlla el cor dels òrgans veïns (Figura 2). Entre l'epicardi i el pericardi parietal s'hi troba la cavitat pericàrdica, que afavoreix els

moviments rítmics del cor gràcies a la presència d'una petita quantitat de líquid al seu interior.



**Figura 2. Esquema de les capes que conformen el teixit cardíac.** L'endocardi, és la capa més interna del cor, seguida del miocardi i l'epicardi (capa més externa). El cor està embolcallat per una capa serosa anomenada pericardi. (Adaptat de referència <sup>2</sup>).

## El miocardi

El miocardi s'encarrega de la funció de bombeig del cor, la qual és portada a terme per un conjunt de cèl·lules especialitzades, els miòcits cardíacs. Tot i que els miòcits cardíacs ocupen aproximadament el 75% del volum total del teixit cardíac, només representen el 30-40% de la fracció cel·lular. La població cel·lular majoritària al miocardi són els fibroblasts. Comparativament, altres tipus cel·lulars com les cèl·lules endotelials (CE) i les cèl·lules musculars llises dels vasos (*Vascular smooth muscle cells*, VSMC) representen un percentatge molt inferior.

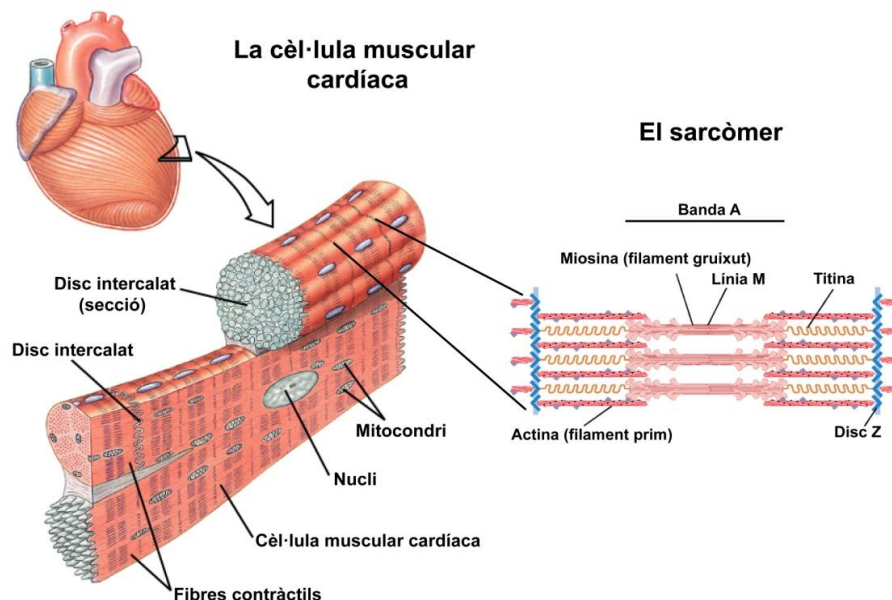
L'estructura del miocardi està diferenciada en dues parts: el parènquima funcional, on trobem els miòcits cardíacs, i l'espai intersticial, format per elements fibril·lars com el col·lagen, fibroblasts, vasos limfàtics, vasos sanguinis i terminacions nervioses. Es poden distingir dos tipus ben diferenciats de teixit cardíac: el miocardi de les aurícules i els ventricles i un teixit miocàrdic especialment diferenciat per la conducció dels estímuls elèctrics, encarregat de mantenir la contracció rítmica del cor. El miocardi dels ventricles és dens, sobretot el del VE, i amb varies fibres que es distribueixen en bandes musculars superficials i profundes. Els seus miòcits adopten una disposició en circumferència, i tenen la capacitat de contraure's durant la *sístole* i relaxar-se durant la *diàstole*. Per altra banda, a les aurícules trobem un miocardi més prim, però que també presenta bandes superficials i bandes profundes. Les fibres es disposen en feixos que formen un enreixat complex que sobresurt cap a l'interior formant relleus irregulars.

## Miòcits cardíacs

La unitat de contracció dels miòcits cardíacs és el sarcòmer, un sistema ordenat de filaments gruixuts integrats per la miosina, i uns filaments prims que contenen l'actina i

proteïnes reguladores, com la troponina i la tropomiosina. Els filaments d'actina neixen dels discs Z, a on s'hi troba l'actina alfa, que és la proteïna que uneix l'actina i la titina. A la banda A del sarcòmer, es troben els filaments de miosina (Figura 3). Els miòcits cardíacs estan formats per fileres de sarcòmers en sèrie que són els responsables del seu aspecte estriat, igual al del múscul esquelètic. La contracció del múscul consisteix en el lliscament dels filaments prim d'actina sobre dels filaments de miosina i està regulat per la intervenció nerviosa i la participació del calci.

Per altra banda, els miòcits cardíacs es troben connectats entre ells a través d'unions específiques anomenades discs intercalars (Figura 3). En cada un dels discs les membranes es fusionen entre si i formen unions comunicants entre cèl·lules adjacents (*gap junctions*), permetent així una ràpida difusió d'ions al llarg de l'eix longitudinal i afavorint d'aquesta manera la propagació de l'estímul elèctric.



**Figura 3. Esquema de l'organització de la cèl·lula muscular cardíaca i del sarcòmer.** A l'esquerra s'observa una secció de teixit cardíac, on es pot diferenciar una cèl·lula muscular cardíaca i els discs intercalars de la membrana. A la dreta, ampliat, s'observa l'estructura d'un sarcòmer limitat pels discs Z. (Adaptat de: Geneser F. *Histología*, 3ª edició, año 2000, pg.321. Editorial Hispana Panamericana).

### Fibroblasts

Els fibroblasts són cèl·lules d'origen mesenquimal encarregades de l'homeòstasi de la matriu extracel·lular (MEC), mitjançant la producció de col·lagen de tipus I, III i IV, i altres factors com citocines, factors de creixement i metal·loproteïnes de la matriu (MMPs)<sup>3-5</sup>.

A més d'una funció estructural, els fibroblasts també regulen les propietats mecàniques i elèctriques del cor<sup>6,7</sup>. Gràcies a les comunicacions que estableixen amb els miòcits i la

MEC, els fibroblasts són capaços de funcionar com a sensors d'estímuls mecànics a través de diferents mecanismes que inclouen receptors transmembrana (integrines), canals iònics i missatgers secundaris. Els estímuls mecànics activen vies de transducció de senyal que desencadenen processos cel·lulars com la proliferació i la secreció de components de la MEC, factors de creixement i MMPs. A més, els fibroblasts també poden respondre als estímuls mecànics amb canvis en el seu potencial de membrana, a través de l'activació de canals de sodi, potassi i calci sensibles a l'estirament, contribuint d'aquesta manera a la senyalització elèctrica del cor<sup>8</sup>. Estudis *in vitro* suggereixen que les *gap junctions* entre els fibroblasts i els miòcits modulen aquesta resposta<sup>9,10</sup>.

Estudis en animals han descrit diferències en la morfologia, mida, secreció, proliferació i expressió de marcadors de diferenciació en resposta a factors de creixement i citocines, entre els fibroblasts presents als ventricles i els fibroblasts presents a les aurícules<sup>11,12</sup>. Aquestes característiques específiques segons la cavitat cardíaca poden donar lloc a una resposta diferent enfront a diferents estímuls o agressions i, en conseqüència, a una susceptibilitat a la fibrosi diferent segons el teixit. En aquest context, els fibroblasts auriculars *in vitro* tenen una resposta més exagerada al factor de creixement transformant beta (TFG- $\beta$ ) en comparació amb els fibroblasts ventriculars, augmentant la síntesi de col·lagen<sup>13</sup>.

### **Matriu extracel·lular**

La MEC cardíaca és una xarxa dinàmica i complexa formada essencialment per proteïnes estructurals, proteïnes no estructurals i sucres: glicoproteïnes, proteoglicans i glicosaminoglicans<sup>14</sup>. El component principal de la MEC és el col·lagen tipus I ( $\approx 80\%$ ), que proporciona rigidesa, i el col·lagen tipus III ( $\approx 10\%$ ), que proporciona elasticitat i, en menor proporció, la laminina i la fibronectina. La capa de MEC que es troba rodejant les cèl·lules, anomenada membrana basal, es compon de fibril·lina, col·lagen tipus IV i V i proteoglicans. Aquestes proteïnes participen en la senyalització cel·lular, interaccionant amb receptors de membrana (integrines) i unint-se a factors de creixement i enzims proteolítics.

L'homeòstasi i recanvi cel·lular de la MEC es troba estretament regulat per l'equilibri entre enzims proteolítics com les MMPs, els inhibidors tissulars de les MMPs (TIMPs) i factors de creixement com el TGF- $\beta$ . A més, els fibroblasts també incrementen o disminueixen la taxa de síntesi i degradació de la MEC en resposta a la demanda del miocardi.

La funció principal de la MEC és donar suport físic als tipus cel·lulars presents al miocardi (miòcits, fibroblasts, cèl·lules del sistema immune, cèl·lules vasculares, etc). Tanmateix, actualment se sap que la MEC no només serveix com a suport estructural sinó que és

una estructura funcionalment molt activa, gràcies a les interaccions que estableix amb les cèl·lules que la rodegen i al contacte amb hormones, factors de creixement i altres molècules que circulen a través de l'espai extracel·lular. La MEC serveix de transductor de senyals entre les comunicacions cèl·lula-cèl·lula i modula la migració, la supervivència i la proliferació cel·lular. A més, la MEC regula altres molècules dins l'espai intersticial, distribueix les forces mecàniques del cor i juga un paper clau en la funció cardíaca a través de l'alineament dels miòcits, la regulació del flux sanguini, i la determinació de les propietats elàstiques i de rigidesa adequades del teixit miocàrdic. Per tant, la MEC és essencial a l'hora de mantenir la integritat cardíaca i la funció de bombeig del cor<sup>15</sup>.

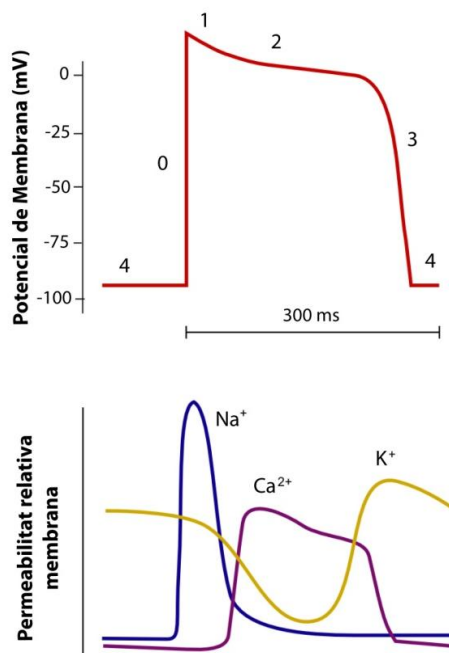
### **1.1.1.3. Fisiologia del múscul cardíac**

#### **Potencial d'acció del múscul cardíac**

Totes les cèl·lules tenen un potencial elèctric (voltatge) a través de les seves membranes. Aquests potencials de membrana existeixen perquè les concentracions del citoplasma són diferents a les de l'espai extracel·lular i els ions que difonen a través de les membranes, generen gradients elèctrics. Els tres ions determinants més importants del potencial de membrana cardíac són els ions de sodi ( $\text{Na}^+$ ) i calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ), més concentrats en l'espai extracel·lular que a l'interior de les cèl·lules, i els ions de potassi ( $\text{K}^+$ ), que tenen una distribució oposada. En els miòcits en repòs, hi ha un predomini d'ions negatius, generant una diferència de potencial entre els dos costats de la membrana que resulta en un potencial de membrana amb un valor negatiu. La difusió d'aquests ions a través de la membrana es dona a través de canals integrats a la membrana específics per a cada ió que poden estar en un estat obert, tancat o inactiu. La permeabilitat de la membrana a un ió específic es relaciona directament amb el número de canals oberts per aquest ió en un moment determinat.

El potencial d'acció (PAC) és la unitat bàsica de la transmissió de l'estímul elèctric i representa el canvi del potencial de membrana en funció del temps en un punt determinat de la membrana del miòcit. Cal remarcar que els PAC de les cèl·lules del múscul cardíac difereixen dels PAC de les cèl·lules del múscul esquelètic permetent una excitació rítmica sincronitzada del cor. La figura 4 representa un esquema de la morfologia d'un PAC d'un miòcit, el qual se'l coneix com a PAC de resposta ràpida. Els PAC de resposta ràpida es caracteritzen per una despolarització ràpida (fase 0) amb un voltatge a l'interior de la cèl·lula positiu, una ràpida reversió del potencial (fase 1), una meseta llarga (fase 2) i una repolarització (fase 3). L'obertura i inactivació dels canals iònics generen corrents transmembrana que modifiquen els PAC i configuren la seva morfologia. Durant la fase de repòs, les membranes són més permeables al  $\text{K}^+$ , al  $\text{Na}^+$  o al  $\text{Ca}^{2+}$ . Per tant, el PAC s'aproxima al potencial d'equilibri del potassi (-90mV) durant aquest període. El PAC

s'inicia quan una porció de membrana es despolaritza lleument (-70mV). Aquesta lleu despolarització inicia la fase 0 que desencadena una obertura dels canals de  $\text{Na}^+$ . Això provoca una corrent ràpida d'ions  $\text{Na}^+$ , de càrrega positiva, cap a l'interior del miòcit, modificant el PAc. Tal i com s'observa a la figura 4, aquest període té una vida curta i és seguit per un increment més lent de la permeabilitat de la membrana al  $\text{Ca}^{2+}$  i una disminució de la seva permeabilitat al  $\text{K}^+$ , que inicia la repolarització de la fase 1. La fase d'estabilització o meseta es caracteritza per un equilibri entre les corrents despolaritzants i repolaritzants (fase 2). Finalment, la membrana es repolaritza (fase 3) al seu potencial de repòs original, degut a un augment de la permeabilitat al  $\text{K}^+$  i una disminució de la permeabilitat al  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$ , que retornen als seus valors de repòs. En la fase 4, els únics canals oberts són els de  $\text{K}^+$ , els quals determinen el PAc de la membrana en repòs.



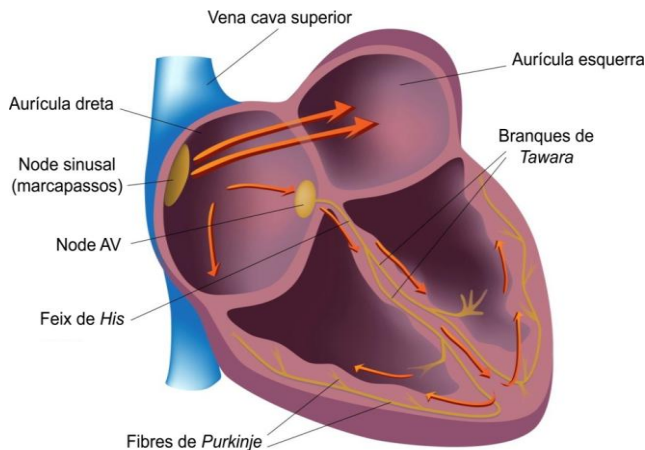
**Figura 4. Fases del potencial d'acció (PAC) cardíac i principals corrents iòniques.** La fase 4 correspon al potencial de membrana de repòs. La fase 0 inicia la despolarització, seguida d'una repolarització petita (fase 1) que continua amb la fase 2. La fase 3 o repolarització retorna al potencial en repòs.

### Formació i transmissió de l'estímul al cor

El miocardi auricular i ventricular es comporta a nivell funcional com un sinciti, és a dir, com si les cèl·lules entre elles estiguessin fusionades. Per aquest motiu, en condicions fisiològiques, un estímul generat a les aurícules o als ventricles produeix una contracció completa de les dues aurícules o ventricles. De manera normal, l'inici de l'estimulació elèctrica del cor es produeix al node sinusal (NS), que actua com a marcapassos cardíac i es troba situat a la porció alta de l'aurícula dreta (AD), a prop de la desembocadura de la vena cava superior (Figura 5). El NS és un teixit muscular específic capaç de mantenir de forma automàtica la contracció rítmica i periòdica del cor. L'excitació elèctrica es transmet per les aurícules per feixos específics des del NS al node auriculoventricular (node AV), per continuar pel feix de *His*, el qual es ramifica en les dues branques de *Tawara*, fins les



fibres de *Purkinje*, encarregades de promoure l'excitació dels ventricles (Figura 5). En els ventricles, l'estímul es propaga d'endocardi a epicardi i des de l'àpex fins a la base. Les cèl·lules del NS no tenen un potencial de repòs constant, sinó que després de cada repolarització, es desencadena un nou PAC de manera espontània, el potencial de marcapassos. Cada PAC del NS determina en condicions normals un batec cardíac, per tant, la freqüència dels impulsos del marcapassos determinen la freqüència del batec cardíac (FC).

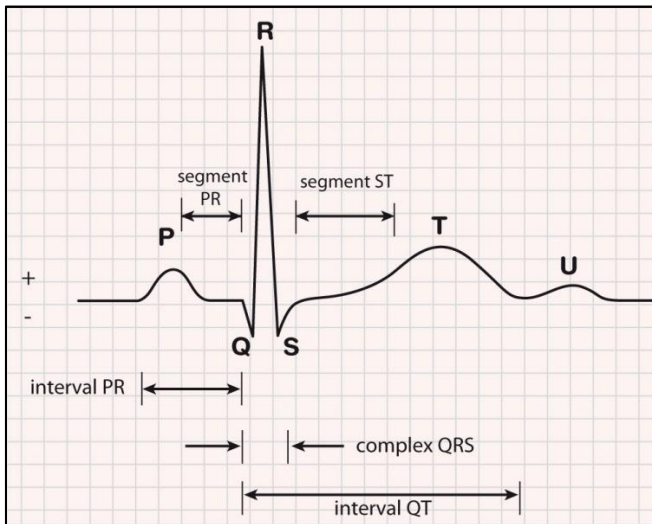


**Figura 5. Imatge esquemàtica del sistema de conducció elèctrica del cor.** (Adaptat de referència <sup>16</sup>).

## L'electrocardiograma

Gràcies al període refractari dels miòcits, és a dir, a l'interval de temps durant el qual la cèl·lula que ha sofert un impuls i no pot ser excitada de nou, l'ona elèctrica es propaga pel cor cíclicament mantenint una contracció asincrònica entre aurícules i ventricles. Aquest front d'ona avança en una única direcció i és el que s'observa en un electrocardiograma (ECG). Concretament, l'ECG mostra les diferències de potencial (mV) produïdes per l'excitació cardíaca i ens aporta informació sobre la posició del cor, la FC, el ritme cardíac, la transmissió de l'impuls elèctric i les seves alteracions. En la figura 6 s'observa un traçat estàndar d'un ECG corresponent a un batec cardíac, on es poden diferenciar clarament tres deflexions anomenades ones: P, QRS, T. La ona P (generalment amplitud  $<0.3\text{mV}$ , duració  $<0.1\text{s}$ ) correspon a la despolarització auricular. El complex QRS ( $<0.1\text{s}$ ) correspon a la despolarització dels ventricles, i la ona T a la seva repolarització. La repolarització de les aurícules no es sol visualitzar ja que queda oculta en el complex QRS. Els segments PQ i ST (absència d'activitat elèctrica) es localitzen aproximadament a nivell de 0 mV. La mida i perfil de les ones així com l'espai de temps transcorregut entre les diferents ones, ens aporta informació sobre la presència d'anomalies. Els intervals principals són: l'interval PQ (des de l'inici de la P fins al final de la Q;  $<0.2\text{s}$ ), el qual es correspon amb el temps de transmissió auriculoventricular; i l'interval QT (des del principi

de la Q fins al final de la T), el qual es correspon a la durada conjunta de la despolarització i repolarització ventricular i depèn de la FC, assolint un valor de 0.35-0.4 s.



**Figura 6. Electrocardiograma (ECG).** Corba ECG corresponent a un batec cardíac. Es poden diferenciar clarament tres ones: P, QRS i T. (Adaptat de referència <sup>17</sup>).

#### 1.1.1.4. Bombeig cardíac

##### El cicle cardíac

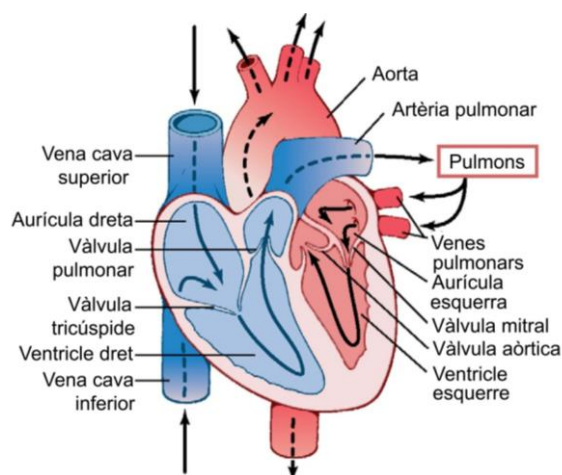
El cicle cardíac representa tota la seqüència de bombeig del cor. Les fases del cicle cardíac són la sístole i la diàstole.

Durant la diàstole del cicle cardíac, s'inicia l'obertura de les vàlvules auriculoventriculars. En aquesta fase, tant les aurícules com els ventricles estan relaxats. S'inicia el període d'ompliment durant el qual la sang oxigenada procedent dels pulmons s'acumula a l'AE (Figura 7) i es buida ràpidament amb l'obertura de la vàlvula mitral dins el VE, disminuint inicialment la pressió auricular. Més endavant, la pressió a ambdues cavitats s'igualava lentament, amb l'ompliment de forma passiva amb la sang provinent del retorn venós. A la meitat de la diàstole, els ventricles estan pràcticament plens. Al final de la diàstole, s'inicia la contracció auricular per la despolarització dels miòcits auriculars que es reflecteix amb la ona P de l'ECG. En aquesta fase, els ventricles estan relaxats i les vàlvules auriculoventriculars estan obertes, mentre que les vàlvules semilunars (pulmonar i aòrtica), romanen tancades. La contracció auricular impulsa el 20% restant de sang cap als ventricles (volum telediastòlic).

La sístole ventricular s'inicia quan el PAc travessa el node AV i es transmet als ventricles (complex QRS de l'ECG), iniciant-se la despolarització ventricular. La contracció dels ventricles causa que la pressió intraventricular s'elevi per sobre de la pressió a les

aurícules, provocant el tancament de les vàlvules auriculoventriculars (mitral i tricúspide). La pressió dins dels ventricles continua incrementant a mida que continua la contracció (contracció isovolumètrica) i quan aquesta excedeix la pressió de l'artèria aorta i pulmonar, s'obren les vàlvules semilunars. Aquesta fase té una duració aproximada de 250 ms, durant els quals el ventricle expulsa aproximadament la meitat del seu contingut (uns 60-70 ml de sang) a l'aorta i l'artèria pulmonar. En aquesta fase, la pressió del ventricle augmenta de manera simultània a la de l'aorta i l'artèria pulmonar, degut a que els miòcits ventriculars continuen contraient-se, fins arribar a un màxim (pic de pressió sistòlica). En aquest punt, la força de contracció ventricular comença a disminuir, la pressió a l'aorta i artèria pulmonar comença a minvar i la sang es distribueix a la resta de l'organisme i cap a la circulació pulmonar. Al final de l'ejecció, la pressió intraventricular cau per sota de la pressió aòrtica i pulmonar, fet que provoca un tancament de la vàlvula aòrtica i pulmonar. S'inicia la repolarització dels miòcits ventriculars (diàstole inicial). Durant un breu interval de temps, o fase de relaxació isovolumètrica, les vàlvules auriculoventriculars es mantenen tancades. En aquesta fase els ventricles són cavitats tancades i emmagatzemen un volum aproximat de 60-70 ml de sang (volum residual o volum telesistòlic). La pressió al seu interior disminueix progressivament coincidint amb la relaxació ventricular. Al final d'aquesta fase, la pressió intraventricular cau per sota de la pressió auricular, de manera que s'obren les vàlvules auriculoventriculars i s'inicia un nou cicle cardíac. La quantitat de sang expulsada del ventricle durant el batec cardíac el volum sistòlic (VS, ml/batec), és igual al volum telediastòlic menys el volum telesistòlic ventricular.

$$VS = \text{vol. telediastòlic} - \text{vol. telesistòlic}$$



**Figura 7. Estructura del cor i sentit del flux sanguini a través de les cavitats cardíques i de les vàlvules cardíques.** (adaptat de: Guyton y Hall. *Tratado de fisiología médica*. 12ª edición. Unidad 2, capítulo 9. Editorial Elsevier Saunders).

## Cabal cardíac

La funció principal del cor és generar i mantenir un flux de sang constant per tal de proporcionar una perfusió adequada als òrgans del cos. Mitjançant la contracció cardíaca, el cor genera la pressió suficient per impulsar la sang continguda al seu interior, des del VE fins a l'interior de l'aorta a través de la vàlvula aòrtica. De forma simultània, el VD es contrau per impulsar la sang a través de la vàlvula pulmonar cap a l'artèria pulmonar i poder així perfondre la sang cap als pulmons. Cada vegada que el cor batega, el volum de sang que s'impulsa a l'aorta és el mateix que el que s'impulsa a l'artèria pulmonar.

El cabal cardíac (CC) és el volum de sang bombejat pels ventricles cada minut, i s'obté a partir de multiplicar la FC (nº batecs/minut) pel VS (ml/batec). Per tant, modificacions de la FC o del VS o d'ambdós, poden canviar el CC.

$$CC = (VS) \times (FC)$$

El reguladors principals de la FC són l'activitat dels nervis simpàtics i parasimpàtics que influeixen en les cèl·lules del NS: augments de l'activitat simpàtica incrementen la FC, mentre que elevacions de l'activitat parasimpàtica la disminueixen. Aquests factors tenen efectes immediats i, per tant, promouen ajustos molt ràpids del CC.

## Regulació del volum sistòlic

Existeixen tres mecanismes principals que regulen tant el volum telediastòlic com el volum telesistòlic i que, per tant, poden modificar el VS: la precàrrega, la postcàrrega i l'inotropisme.

### Precàrrega

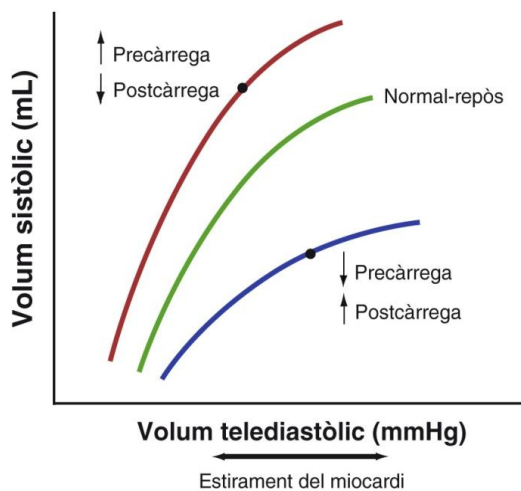
La precàrrega és el grau d'estirament del miocardi abans de contraure's. És a dir, és la pressió que causa la distensió del ventricle al final de la diàstole i depèn del volum telediastòlic. La llei de *Frank-Starling* (Figura 8) estableix que canvis en la precàrrega poden afectar al VS: un increment del retorn venós al cor incrementa el volum telediastòlic, que a la vegada incrementa l'estirament del múscul cardíac i, en conseqüència, la precàrrega. Per tal d'impulsar aquest volum addicional de sang, el cor incrementa la força de contracció ventricular. Així doncs, un increment del volum telediastòlic donarà lloc a un increment del VS i, de manera oposada, una disminució del volum telediastòlic, donarà lloc a una disminució del VS a través del mateix mecanisme.

## Postcàrrega

La postcàrrega és la càrrega que s'oposa a l'estirament del miocardi. La postcàrrega ve determinada per la pressió aòrtica però també pel volum i gruix de la cavitat ventricular. Canvis en la postcàrrega afecten a la capacitat del ventricle per impulsar la sang i, per tant, afecten al volum telesistòlic. Per exemple, un increment de la postcàrrega per un increment de la pressió a l'aorta, augmenta el volum telesistòlic i disminueix el VS.

## Inotropisme

L'inotropisme correspon a la força intrínseca que genera el ventricle en cada contracció (potència cardíaca o contractilitat), independentment de la precàrrega i la postcàrrega. Un increment de l'inotropisme causat per exemple, per un augment de l'activitat simpàtica, incrementa el VS i disminueix el volum telesistòlic. D'altra banda, una disminució de l'inotropisme, redueix el VS i incrementa el volum telesistòlic. Cal tenir en compte que els efectes dels canvis dels volums telesistòlic i telediastòlic no són independents. Un increment del volum telesistòlic generalment dóna lloc a un increment compensatori del volum telediastòlic.



**Figura 8. Corba de Frank-Starling.** La corba verda representa una corba de funció ventricular normal. Un increment de la precàrrega (línia vermella), incrementa el volum telediastòlic i el VS. Una disminució de la precàrrega (línia blava), disminueix el volum telediastòlic i el VS.

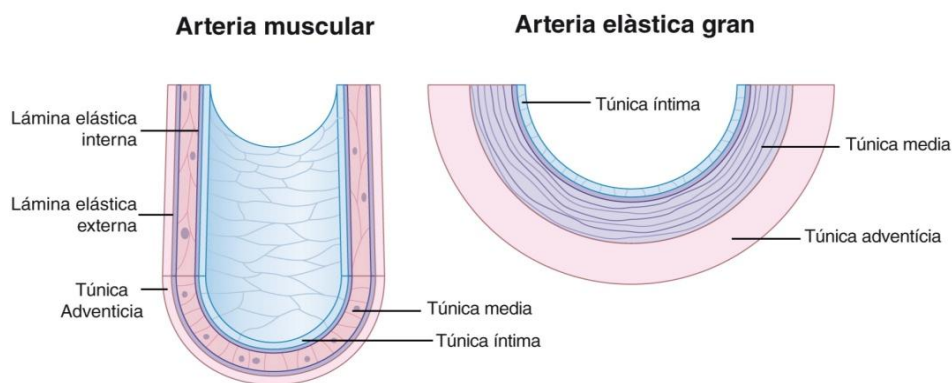
### 1.1.1.5 Els vasos sanguinis

L'arquitectura general i la composició cel·lular dels vasos sanguinis és igual en tot el sistema cardiovascular. La majoria dels vasos del sistema circulatori tenen tres capes o túniques (Figura 9):

- **Túnica íntima:** És el revestiment intern format per una capa de cèl·lules epitelials planes, o endoteli, el qual està suportat per un delicat teixit connectiu compost de

col·lagen, elastina i altres glicoproteïnes. Es troba separada de la túnica media per la làmina elàstica interna.

- **Túnica media:** És la capa central i està formada principalment per VSMCs, entremig de les quals també trobem quantitats variables d'elastina, fibres reticulars i proteoglicans. El seu límit extern correspon a la làmina elàstica externa.
- **Túnica adventícia:** És la capa més externa i està poc definida. Està formada per teixit connectiu de fibres de col·lagen i elastina, fibres nervioses i petits vasos de paret fina, anomenats *vasa vasorum*.



**Figura 9. Esquema de la paret vascular.** Secció transversal d'una artèria muscular i d'una artèria elàstica gran (Adaptat de referència <sup>18</sup>).

Tot i així, els vasos presenten característiques específiques segons regions determinades de l'organisme o exigències funcionals concretes. D'aquesta manera, els vasos sanguinis es poden classificar en tres classes: artèries, venes i vasos capil·lars. La sang que surt del cor a elevada pressió es distribueix pel cos mitjançant un sistema ramificat d'artèries, amb una túnica media més gruixuda. Els vasos de distribució més distals, o arterioles, són les que aporten la sang oxigenada als capil·lars (els quals pràcticament no presenten túnica media). Finalment, els capil·lars són els encarregats de portar a terme l'intercanvi d'oxigen, nutrients, productes de rebuig i altres substàncies al líquid extracel·lular. Per altra banda, la sang desoxigenada passa de les vènules (amb una paret molt fina), a petites venes que desemboquen finalment a venes de calibre més gran: la vena cava superior i inferior. Aquestes són les que transporten la sang pobre en oxigen altra vegada al cor.

### **Túnica íntima: endoteli**

L'endoteli no és només una monocapa de CEs que recobreix l'interior dels vasos sanguinis i del cor, sinó que actualment és considerat un òrgan essencial per a la fisiologia vascular i la seva disfunció pot ser un factor crític en la patogènesi de la malaltia cardiovascular (MCV).

Les característiques de les CEs, són diferents segons el tipus de vas sanguini que formin, de la seva situació i de la funció que desenvolupin. Per exemple, en les artèries, les CEs es troben alineades en direcció al flux sanguini i tenen una forma allargada i estreta en comparació amb les venes, on adopten una forma més arrodonida. L'endoteli d'artèries i venes és un continu de CEs sense interrupcions, amb unions estretes entre elles. En canvi, l'endoteli dels capil·lars pot ser continu fenestrat o discontinu, segons les exigències funcionals del teixit<sup>19</sup>.

Les CEs separen físicament la paret dels vasos dels components de la circulació sanguínia, actuant com a barrera mecànica semipermeable. Les funcions principals de l'endoteli són el manteniment de la homeòstasi vascular i la regulació del to vascular, del flux sanguini tissular i de la pressió arterial (PA)<sup>20</sup>. L'endoteli funciona com un sensor d'estímuls mecànics, com la pressió o el *shear stress* (fregament) i d'estímuls hormonals, com les substàncies vasoactives alliberades en sang<sup>21</sup>. En resposta als estímuls, l'endoteli allibera a la llum del vas substàncies que regulen la funció vasomotora, inicien processos inflamatoris o intervenen en l'homeòstasi.

### **Túnica media: múscul llis i matriu extracel·lular**

#### La cèl·lula muscular llisa

Les VSMCs conformen una estructura organitzada de proteïnes contràctils i citoesquelètiques que aporten una major capacitat de distensió a les artèries, a través de la síntesi, secreció i organització de components de la MEC que tenen propietats altament elàstiques i flexibles. Una característica de les VSMCs consisteix en adaptar l'expressió de proteïnes implicades en la contracció i síntesi de la MEC en funció dels estímuls extrínsecs i intrínsecs durant diferents etapes del desenvolupament, en condicions patològiques o en resposta a una lesió. Aquest fenomen s'anomena modulació fenotípica<sup>22-24</sup>, i consisteix en passar d'un fenotip immadur anomenat sintetitzador amb capacitat de migració present durant l'embriogènesi, a un fenotip diferenciat contràctil, present als vasos madurs. En resposta a una lesió, es produeix un remodelat del vas, i les VSMCs adquireixen la capacitat de passar al fenotip sintetitzador, i augmentar la proliferació i síntesi de la MEC amb l'objectiu de reparar la lesió.

#### Matriu extracel·lular

Una de les funcions més importants de la VSMC és secretar, organitzar i mantenir l'arquitectura complexa de la MEC de la túnica media, que varia en funció de les regions vasculars. Els components de la MEC es classifiquen en molècules formadores de fibres (col·lagen i elastina), molècules no formadores de fibres o interfibril·lars (proteoglicans i glicoproteïnes) i proteïnes matricel·lulars (trombospondina 1 i 2, SPARC, tenascina C i

osteopontina) que modulen les interaccions entre les cèl·lules i la matriu durant la reparació tissular. Al contrari del col·lagen, la elastina té una baixa resistència a la tensió, té capacitat de distendre's i distribueix la càrrega a través de la paret. L'elastina és la principal proteïna de la paret arterial, representant fins el 50% del pes sec de l'aorta<sup>25</sup>. Les VSMCs secreten monòmers de tropoelastina que després de patir modificacions post-traduccionals, s'entrecreuen i s'organitzen en làmines elàstiques formant circumferències o anells dins la túnica media. Entre les làmines elàstiques trobem de forma alterna anells compostos de VSMCs, formant unitats laminars. Finalment, les microfibril·les són estructures fibroses íntimament associades a les fibres elàstiques que envolten al nucli d'elastina. La fibril·lina 1 és el component estructural de la microfibril·la.

### **Túnica adventícia: fibroblasts i teixit connectiu**

La túnica adventícia està formada per teixit connectiu lax, majoritàriament per col·lagen i fibroblasts. L'adventícia té un paper crític en la regulació del diàmetre de la llum vascular i en la difusió de nutrients cap a la túnica media i la túnica íntima<sup>26</sup>. Estudis recents mostren que la túnica adventícia és un compartiment dinàmic important pel trànsit cel·lular a través de la paret arterial, permetent la comunicació entre les CEs i les VSMCs i el seu entorn<sup>27</sup>. A més, la túnica adventícia conté poblacions residents de macròfags, cèl·lules T, cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques i mastòcits, les quals juguen un paper important en la resposta immunitària innata<sup>27</sup>. Diversos estudis han investigat una població de cèl·lules de l'adventícia que expressen marcadors de cèl·lula mare<sup>27</sup>. Es creu que tant els fibroblasts de la túnica adventícia com la presència de cèl·lules residents progenitores juguen un paper clau en la reparació tissular en resposta a un dany.

#### **1.1.1.6. Les artèries**

Les artèries tenen la funció de distribuir la sang que surt del cor. Per tal de suportar aquest flux sanguini pulsatiu a altes pressions, les artèries necessiten tenir unes parets més gruixudes que les venes. Existeixen diferents tipus d'artèries, que es poden distingir entre sí pel seu diàmetre, per les quantitats relatives de teixit elàstic o muscular de la túnica media, pel gruix de les seves parets respecte a la llum, i per la seva funció. Així doncs, trobem:

- Grans artèries elàstiques (artèries de conducció): Contenen una proporció molt alta de làmines elàstiques a les seves parets. Les seves propietats elàstiques els permeten dilatar-se quan reben la sang que ve dels ventricles, minimitzant el canvi de pressió, així com retornar al seu estat inicial al final de les contraccions ventriculars, durant les quals impulsen la sang a les artèries de calibre mitjà. Exemples d'aquestes artèries són l'aorta, l'artèria pulmonar i la caròtida.



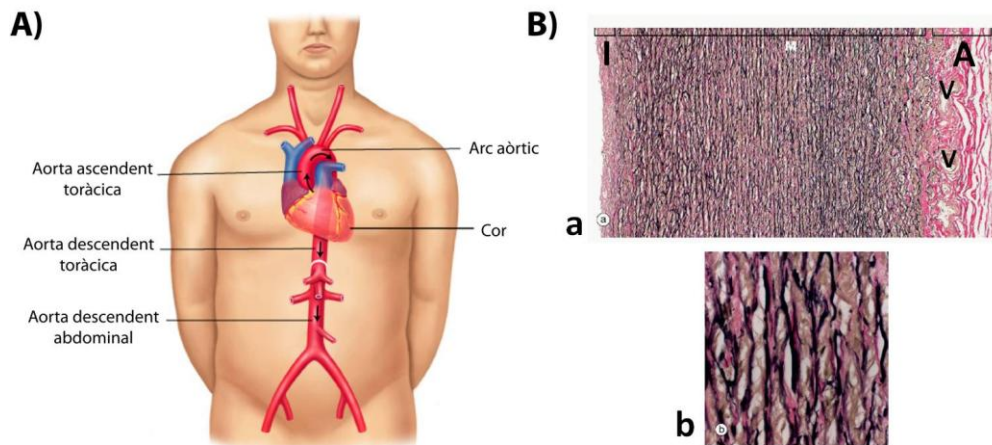
- Artèries musculars de calibre mitjà (artèries de distribució): Les seves parets estan formades principalment per múscul llis disposat en fibres circulars. Tenen la capacitat de disminuir el seu diàmetre (vasoconstricció) per tal de poder regular i distribuir el flux sanguini cap a diferents parts de l'organisme, segons els requeriments necessaris. Exemple: les artèries coronàries.
- Artèries de calibre petit i arterioles (artèries de resistència): Són de mida petita, estretes però amb parets musculars gruixudes. Tenen una funció molt important en la regulació del nivell de la PA dins del sistema vascular.

### L'aorta

L'aorta és la principal artèria de conducció del cos humà i el vas sanguini de major calibre. Recorre tota la longitud del tronc transportant sang oxigenada cap als teixits perifèrics a través de les seves branques. El seu origen es troba a nivell del VE i al llarg del seu trajecte es distingeixen diverses parts (Figura 10 A):

- Aorta ascendent: Segment ascendent de l'aorta amb origen al VE, darrere de l'artèria pulmonar, a l'alçada de la quarta vèrtebra toràcica.
- Arc aòrtic: Descriu una corba cap enrere i cap a l'esquerra, creuant per sobre de la tràquea i de l'esòfag i la bifurcació de l'artèria pulmonar.
- Aorta descendent: Segueix a l'arc aòrtic amb un trajecte longitudinal descendent posterior cap a l'interior del tòrax, delimitat pels pulmons, per finalitzar travessant el diafragma. A partir d'aquí la porció abdominal de l'aorta descendent continua el seu trajecte fins finalitzar a la quarta vèrtebra lumbar, on es bifurca en les artèries ilíacques comunes.

A nivell histològic, l'aorta es caracteritza per tenir una túnica media gruixuda i amb una alta proporció de làmines elàstiques (Figura 10 B). A la part dreta de la figura 10 (Ba), s'observen microfotografies on es poden diferenciar les tres capes de la paret (túnica íntima I, túnica media M i túnica adventícia A). A grans augments (Bb) es poden observar les làmines d'elastina tenyides de color negre amb la tinció de Van Gieson, separades per col·lagen (tenyit de color vermell/rosa) i una quantitat relativament petita de VSMCs (tenyides de color groc). A la capa adventícia s'hi pot observar la presència de petits *vasa vasorum* (V), que penetren a la part exterior de la túnica media.



**Figura 10. Anatomia i morfologia de l'artèria elàstica aorta.** A) Esquema representatiu de l'anatomia de l'aorta amb cadascuna de les seves porcions: arc aòrtic, aorta toràtica ascendent i descendent (toràtica i abdominal). B) Microfotografies de seccions histològiques d'aorta tenyides amb van Gieson. (Adaptat de: Weather. *Histología funcional. Texto y atlas en color. 6ª edición. Parte III, pg 161. Editorial Elsevier Churchill Livingstone*).

L'artèria aorta és l'artèria més proximal connectada directament al cor i actua com a conducte alhora que com a reservori. Com ja s'ha vist, el component principal de la paret aòrtica són les làmines elàstiques (fins al 40% en l'aorta toràctica). Però aquest percentatge disminueix progressivament des de la zona més proximal a les zones més distals o perifèriques, incrementant proporcionalment la rigidesa vascular. Les propietats elàstiques de l'aorta són molt importants per mantenir la pressió i el flux sanguini al llarg del sistema arterial, esmorteint els canvis de pressió generats pel bombeig cíclic de sang en cada batec cardíac (funció de *Windkessel*)<sup>28</sup>. Durant la sistole, el VE bombeja un volum de 60-100ml de sang dins l'aorta i el sistema arterial. Aproximadament el 50% d'aquest volum d'ejecció és conduit directament a la circulació perifèrica. La resistència perifèrica i l'elasticitat de la paret de l'aorta són els responsables de l'emmagatzematge de l'altre 50% del volum d'ejecció en els segments més proximals de l'aorta. Per altra banda, durant la diàstole la vàlvula aòrtica està tancada i es produeix una disminució de la pressió dins l'aorta. En aquest moment, la paret de l'aorta es retrau i aquesta pressió fa que es bombegi lentament el volum de sang emmagatzemat cap a la circulació perifèrica permetent un flux constant i reduint les pulsacions.

El moviment de la sang a l'aorta durant la sistole està associat a la generació d'una ona de pressió o pols de pressió, que es transmet al llarg de l'arbre arterial. Un cop aquesta ona arriba a la bifurcació cap a les artèries perifèriques, es genera una ona de retorn que reflecteix cap a l'aorta ascendent. La interacció entre la ona d'anada i l'ona de retorn dona lloc a la ona de pols aòrtica, la qual determina el pols arterial, típicament mesurat a nivell de l'artèria radial. La ona generada durant la sistole (ona d'anada) depèn tant de la funció ventricular com de les propietats elàstiques de l'aorta, mentre la ona reflectida (de retorn)

depèn de les propietats elàstiques de l'aorta, de la velocitat de la ona de pols (*pulse wave velocity*, PWV) i de les característiques geomètriques i estructurals de les regions o punts de reflexió més distals al cor.

La PWV es correlaciona inversament amb la capacitat de distensió arterial: el seu valor incrementa progressivament des de l'aorta ascendent fins a la perifèria i actualment es considera el mètode de referència no invasiu per mesurar la rigidesa arterial.

### **La pressió arterial**

Fisiològicament, la pressió sanguínia representa la pressió de la sang arterial dins la circulació sistèmica. La PA es defineix com la força que exerceix la sang contra una unitat de superfície de la paret del vas per on circula. Generalment la PA es mesura amb mil·límetres de mercuri (mmHg).

#### Pressió del pols

Quan la sang és expulsada del VE cap a l'aorta, la pressió aòrtica augmenta. La pressió aòrtica màxima durant la sístole s'anomena pressió arterial sistòlica (Pas). Quan el VE es relaxa, la pressió aòrtica disminueix. El valor més baix de pressió a l'aorta s'observa durant la diàstole, just abans que el VE expulsi la sang a l'aorta, i s'anomena pressió arterial diastòlica (Pad). En un adult jove i sa, la Pas és  $\approx 120$  mmHg, mentre que la Pad és  $\approx 80$  mmHg. La diferència entre aquestes dues pressions, entre 40 i 50 mmHg, es coneix com l'amplitud de la PA o pressió del pols (PP).

$$PP = Pas - Pad$$

Existeixen dos factors principals que influencien la PP: 1) el VS i 2) l'elasticitat arterial o capacitat de distensió (canvi de volum ( $\Delta V$ ) / canvi de pressió ( $\Delta P$ )). Quan el VS incrementa, el volum de sang expulsat a l'arbre arterial és més gran en cada batec i, per tant, la diferència de pressió també és més gran (incrementa la Pas i disminueix la Pad). Com ja s'ha vist abans, l'elasticitat de la paret aòrtica determinarà la capacitat d'esmoreir els canvis de pressió durant el cicle cardíac. Per tant, per un valor concret de VS si l'aorta és menys elàstica, es produeix un major augment de la Pas que de la Pad, i d'aquesta manera la PP incrementa. Per altra banda, si l'elasticitat aòrtica és major, la diferència de pressió serà menor i, per tant, la PP disminuirà.

#### Pressió arterial mitjana

La pressió arterial mitjana (PAM) està determinada pel CC, la resistència vascular sistèmica (RVS) i la pressió venosa central (PVC):

$$PAM = (CC \times RVS) + PVC$$

Ja que la PVC, o pressió de la vena cava toràctica, generalment és pròxima a 0 mmHg, aquesta relació se sol simplificar en la següent equació:

$$PAM = CC \times RVS$$

D'aquesta manera, canvis del CC o de la RVS, afectaran a la PAM. Tot i així, a la pràctica, la PAM no es calcula a partir del CC o de la RVS, sinó que s'estima a partir de la PA mesurada al llarg d'un període de temps. Per una FC normal, la PA es troba més propera a la Pad que a la Pas durant la major part del cicle cardíac i segueix la següent equació:

$$PAM \approx Pad + 1/3 (Pas - Pad)$$

Tanmateix, a FC més altes, la diàstole s'escurça i la Pad té una contribució menor, motiu pel que la PAM s'aproxima més a la mitjana de les Pad i Pas.

#### 1.1.1.6. Control del to vascular

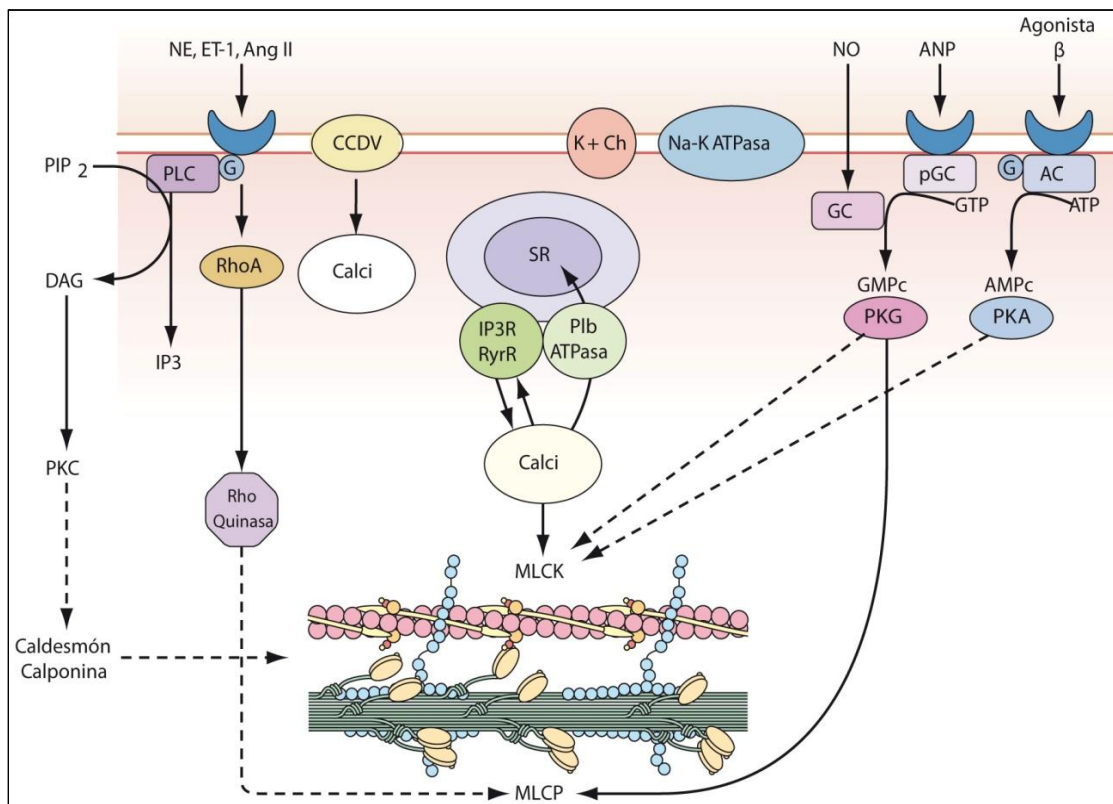
El to vascular es defineix com a l'estat contràctil general d'un vas o d'una regió vascular. La principal funció de les VSMCs és mantenir el to vascular. L'activació de la VSMC es pot iniciar en resposta a estímuls elèctrics o químics i està influenciada pel sistema nerviós autònom i per l'endoteli.

#### Contracció de la VSMC

Les VSMCs tenen un potencial de membrana en repòs entre -40 i -65 mV, que ve determinat, en gran mesura, per la permeabilitat al  $K^+$ . Els PAc s'inicien per una despolarització de la membrana cel·lular, majoritàriament a través de l'obertura de canals de calci dependents de voltatge (CCDV) tipus L, que provoquen un increment de la concentració intracel·lular de calci. Aquest increment de calci intracel·lular pot promoure a la vegada l'alliberament de calci del reticle sarcoplàsmic. El calci lliure citoplasmàtic s'uneix a una proteïna anomenada calmodulina. El complex calci-calmodulina s'uneix i activa la quinasa de cadena lleugera de la miosina (MLCK), que fosforila la cadena lleugera de la miosina (MLC) en presència d'adenosina trifosfat (ATP). La fosforilació de la MLC, que es la subunitat reguladora de la miosina, augmenta la formació d'unions o ponts creuats entre la miosina i els filaments d'actina, permetent la contracció de la VSMC<sup>29</sup> (Figura 11).

Diversos agonistes bioquímics també incrementen la concentració intracel·lular de calci mitjançant l'activació de la fosfolipasa C (PLC) dependent de receptor amb hidròlisi de fosfatidilinositol 4,5-difosfat i generació de diacilglicerol (DAG) i inositol 1,4,5-trifosfat (IP3, inositol). Aquestes molècules derivades de la membrana activen la proteïna quinasa C

(PKC) i incrementen la concentració intracel·lular de calci. A més, l'IP3 s'uneix al seu receptor específic que es troba a la membrana del reticle sarcoplàsmic i incrementa l'alliberament de calci d'aquesta reserva cap al citoplasma (Figura 11).



**Figura 11. Regulació de la concentració de calci intracel·lular en la cèl·lula muscular llisa i contracció dependent d'ATPasa.** AC, adenilil ciclase; Ang-II, angiotensina II; ANP, pèptid natriurètic auricular (atrial natriuretic peptide); DAG, diacilglicerol; G, proteïna G; IP3, inositol 1,4,5-trifosfat; ET-1, endotelina 1; MLCK, quinasa de la cadena lleugera de la miosina (myosin light chain kinase); MLCP, fosfatasa de la cadena lleugera de la miosina (myosin light chain phosphatase); NE, noradrenalina (norepinephrine); NO, òxid nítric; pGC, guanilil ciclase particular (particular guanylyl cyclase); PIP2, fosfatidilinositol 4,5-difosfat (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate); PKA, proteïna quinasa A (protein kinase A); PKC, proteïna quinasa C (protein kinase C) PKG, proteïna quinasa G (protein kinase G); PLC, fosfolipasa C (phospholipase C); sGC, guanilil ciclase soluble (soluble guanylyl cyclase); SR, reticle sarcoplàsmic; CCDV, canal de calci dependent de voltatge (voltage dependent calcium channel). (Adaptat de: *B Berk, Vascular Medicine, 3rd ed, p 23. Philadelphia, Saunders, Elsevier, 2006*).

### Relaxació de la VSMC

La relaxació de la VSMC es produeix quan hi ha una reducció de la fosforilació de MLC a través de la fosfatasa de miosina. Tant el monofosfat d'adenosina cíclic (AMPc) com el monofosfat de guanosina cíclic (GMPc) promouen la relaxació de la VSMC a través de mecanismes complexos. Els agonistes β actuen a través dels seus receptors acoblats a proteïna G, activen l'adenilil ciclase per tal de convertir el trifosfat d'adenosina (ATP) a AMPc. D'altra banda, l'òxid nítric (NO) i el pèptid natriurètic auricular (ANP) mitjançant una acció directa i a través d'un receptor acoblat a proteïna G, respectivament, activen la guanilil ciclase per tal de convertir trifosfat de guanosina (GTP) a GMPc. A la vegada, aquests mediadors intracel·lulars, activen la proteïna quinasa A (PKA) i la proteïna

quinasa G (PKG), respectivament, causant la inactivació de la MLC i disminuint el to de la VSMC. A més, la PKG interacciona de manera directa amb la subunitat fosfatasa de la MLC, augmentant l'activitat de la fosfatasa i disminuint el to vascular. Per últim, altres vies com la de la quinasa Rho també tenen un paper important en la reducció de la concentració de calci intracel·lular (Figura 11).

### **Influència del sistema nerviós**

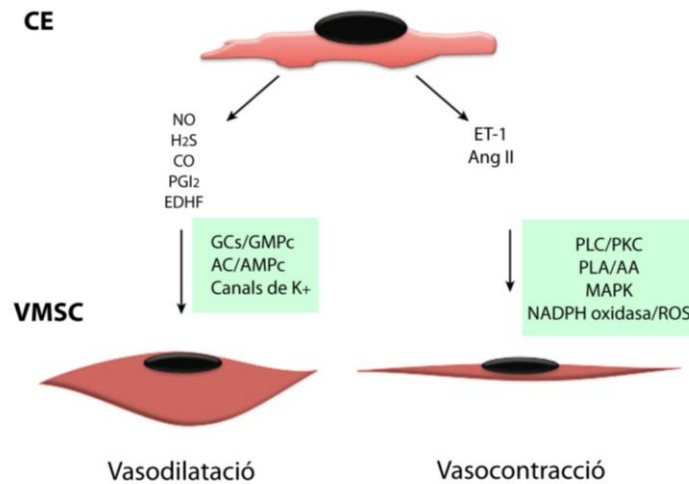
El to de la VSMC està controlat pel sistema nerviós autònom. Les neurones autònomes presents a la túnica mitjana del múscul llis vascular s'activen en resposta a baroreceptors i quimiorceptors presents a l'arc aòrtic i als cossos carotidis i a termoreceptors presents a la pell. A través d'aquests components, es generen reflexes d'acció ràpida modulats per impulsos centrals que responen a estímuls sensorials (olfactius, visuals, auditius i tàctils) i a estímuls emocionals. La regulació autònoma del to vascular està modulada per tres classes de nervis: els nervis simpàtics, a través dels neurotransmissors adrenalina i noradrenalina (NA); els nervis parasimpàtics, amb l'acetilcolina (ACh) com a principal neurotransmissor, i els nervis no adrenèrgics/no colinèrgics (NO, substància P, pèptid intestinal vasoactiu)<sup>30</sup>. Cadascun d'aquests neurotransmissors s'uneix a receptors específics o, com el cas del NO, difón a través de la membrana de la VSMC, per tal de regular la concentració de calci intracel·lular i, en conseqüència, el to vascular.

La NA activa els receptors  $\alpha$  i l'adrenalina els receptors  $\alpha$  i  $\beta$  (receptors adrenèrgics). En la majoria dels vasos sanguinis, la NA activa els receptors  $\alpha_1$  presents a les artèries més grans i els receptors  $\alpha_2$  a les artèries petites i arterioles, desencadenant vasoconstricció de les mateixes<sup>31</sup>. La major part dels vasos sanguinis expressen receptors adrenèrgics  $\beta_2$  en les VSMCs i responen als agonistes  $\beta$  mitjançant la relaxació dependent de monofosfat d'AMPc. L'ACh alliberada per les neurones parasimpàtiques s'uneix als receptors muscarínics (M1-5) presents a les VSMCs per tal de produir la relaxació dels vasos. A més, l'NO estimula les neurones parasimpàtiques per tal d'alliberar ACh, la qual pot estimular a la vegada l'alliberament d'NO per l'endoteli<sup>32</sup>.

### **Influència de l'endoteli**

La regulació del to vascular per l'endoteli es fa mitjançant l'alliberació de factors endotelials que mantenen un equilibri entre la vasodilatació i la vasoconstricció<sup>33</sup> (Figura 12). Entre els factors vasodilatadors, trobem l'NO, el sulfur d'hidrogen, la prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), i el factor hiperpolaritzant endotelial (EDHF). Els seus efectes són contrarestats per l'alliberació de substàncies vasoconstrictores endotelials, com el tromboxà A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) i pèptids com l'endotelina 1 (ET-1) i l'angiotensina II (Ang-II). La funció d'aquestes

substàncies varia entre els llits vasculars; per exemple l'NO és el principal vasodilatador en artèries elàstiques grans.



**Figura 12. Factors vasoactius derivats de l'endoteli.** Les substàncies alliberades per les cèl·lules endotelials (CE) activen diferents vies moleculars dins les cèl·lules musculars llises vasculars (VSMC). GCs (guanilil ciclasa); GMPc (monofosfat de guanosina cíclic); AC (adenilil ciclasa); AMPc (monofosfat d'adenosina cíclic); PLC (fosfolipasa C); PKC (proteïna quinasa C); PLA (fosfolipasa A); AA (metabòlisme de l'àcid araquidònic); MAPK (proteïna quinasa activada per mitògen). (Adaptat de: *Brauwald. Medicina Vascular. 2ª edició. Capítulo 2, pg 31. Editorial Elsevier Saunders*).

### L'òxid nítric

L'NO és un gas soluble biològicament actiu produït per moltes cèl·lules de l'organisme. L'NO és sintetitzat per tres isoformes d'un enzim amb una estructura similar (sintases d'NO): l'enzim constitutiu identificat a l'endoteli (eNOS o NOS3), la sintasa present a les cèl·lules neuronals (nNOS o NOS1) i l'enzim induïble (iNOS o NOS2) que s'expressa a les VSMCs, als neutròfils i als macròfags per l'exposició a endotoxines o citocines inflammatòries<sup>34,35</sup>. Dins del sistema cardiovascular, l'NO és una de les principals substàncies implicades en la distribució del flux sanguini i en el manteniment del vasodilatador basal. A més, l'NO exerceix vèries funcions vasculars com la inhibició del creixement cel·lular i la inflamació, així com un efecte antiagregant plaquetari (antitrombòtic)<sup>36</sup>. Per tal d'exercir aquestes funcions, l'NO és sintetitzat per les CEs a partir de l'aminoàcid L-arginina<sup>37</sup>. Seguidament, l'NO difon cap a les VSMCs on activa l'enzim guanilil ciclasa (GC) per tal de formar el monofosfat de guanosina cíclica (GMPc). Els nivells intracel·lulars de GMPc inhibeixen l'entrada de calci dins la cèl·lula, disminuint la seva concentració intracel·lular i provocant la relaxació de la VSMC<sup>21</sup>.

### Regulació del sistema renina-angiotensina-aldosterona

La funció del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) és mantenir el volum de sang i la PA, i té un paper molt important durant la pèrdua de sodi i líquid de l'organisme.

Una menor entrada de clorur de sodi a la màcula densa del ronyó, una menor perfusió renal i l'estimulació simpàtica, indueixen la secreció de renina de les cèl·lules juxtaglomerulars renals. La renina és alliberada a la circulació on s'encarrega d'escindir l'angiotensinogen circulant a angiotensina I (Ang-I). Tot i que l'Ang-I és inactiva, es converteix ràpidament a Ang-II gràcies a l'enzim convertidor de l'angiotensina 1 (ECA-1) que s'expressa en abundància dins la vasculatura pulmonar i en menor grau, a la circulació perifèrica. A més d'expressar-se a la membrana endotelial, l'ECA-1 també circula de forma soluble.

L'Ang-II és un polipèptic que actua directament sobre receptors acoblats a proteïna G: els receptors d'Ang-II tipus 1 (AT<sub>1</sub>), presents a les VSMCs, i el receptor d'Ang-II tipus 2 (AT<sub>2</sub>), localitzats a la túnica adventícia. La unió amb el receptor AT<sub>1</sub> és la responsable de l'efecte vasoconstrictor de l'Ang II, mentre que la unió al receptor AT<sub>2</sub> s'ha relacionat amb efectes vasodilatadors<sup>38</sup>. S'ha descrit que els efectes vasoconstrictors de l'Ang-II a través del receptor AT<sub>1</sub> són conseqüència de l'activació de les proteïnes G, Gq/G11. Un cop activades i, a través de missatgers secundaris, activen la PLC i es genera inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). L'IP3 i el DAG, de forma paral·lela, incrementen el calci intracel·lular i finalment activen la MLC, permetent la contracció de la VSMC (Figura 11)<sup>39</sup>.

En situacions de pèrdua de volum, l'Ang-II actua dins del ronyó sobre les arterioles eferents renals, augmentant la pressió intraglomerular. També estimula la secreció d'aldosterona de la glàndula suprarenal. L'aldosterona reforça l'efecte vasoconstrictor de l'Ang-II incrementant la reabsorció renal de sodi i augmentant el volum intravascular a través dels receptors per a mineralcorticoides de les cèl·lules del ronyó i de l'activació del canal de sodi epitelial.

#### 1.1.1.7. Farmacologia vascular

La farmacologia vascular està centrada tradicionalment en els fàrmacs que modulen el to vascular i que s'usen àmpliament pel tractament de diverses patologies com la hipertensió arterial, la isquèmia miocàrdica, el vasoespasme, etc. A part del to vascular, moltes d'aquestes substàncies farmacològiques també modulen el creixement cel·lular, la inflamació, la trombosi i el remodelat vascular, actuant sobre diverses vies moleculars. Concretament, els fàrmacs que influeixen en la via de la proteïna quinasa dependent d'NO, una important diana terapèutica, tenen una important rellevància en la present tesi doctoral. Aquesta via és força complexa ja que, tal i com s'ha descrit anteriorment, es troba influenciada per diferents molècules com l'enzim GC, el GMPc, la PKG i les fosfodiesterases (PDE).



## **Inhibidors de la fosfodiesterasa**

Les PDEs són enzims amb activitat metal·lohidrolasa, és a dir, que catalitzen la disrupció de l'AMPc o el GMPc a les seves formes inactives 5'-AMP o GMP, modulant així tant la duració com la intensitat de la resposta intracel·lular d'AMPc i GMPc. La família de PDEs es troben àmpliament distribuïdes per tot l'organisme, diferenciant-se en 11 tipus diferents. Les PDEs 5, 6 i 9 mostren una alta selectivitat pel GMPc, mentre que la PDE 3 i 10 tenen selectivitat per l'AMPc. D'altra banda, les PDEs 1, 2 i 11 mostren especificitats duals als substrats GMPc i AMPc<sup>40</sup>.

Al llarg dels últims anys s'ha descrit l'especificitat de diferents PDEs per a diferents teixits, lligada a funcions fisiològiques concretes. La inhibició específica de les PDEs pot tenir diversos efectes en diferents condicions patològiques i, per tant, resulten ser una diana terapèutica de gran interès. En el sistema cardiovascular, les PDEs predominants són la PDE1, 2 i 5. La PDE5 s'expressa en el teixit del cos cavernós del penis, però també a la vasculatura pulmonar i sistèmica i al miocardi<sup>41</sup>. La seva funció principal és l'hidròlisi del segon missatger GMPc. El GMPc es genera per l'enzim GC a partir de la guanosina trifosfat (GTP). Existeixen dues famílies de GCs: les GC en forma de receptors presents a la membrana cel·lular (pGCs) i activats específicament pels pèptics natriurètics; i les GCs solubles del citoplasma (sGCs), les quals són activades per l'NO i el monòxid de carboni. L'efecte principal del GMPc és l'activació de la PKG, la qual regula un gran nombre de funcions biològiques com la relaxació de les VSMCs, la funció plaquetària, la divisió cel·lular i la síntesi d'àcids nucleics entre d'altres<sup>42-44</sup>. Per altra banda, el GMPc també pot activar la PKA, la qual juga un paper molt important en molts processos cel·lulars com la regulació del metabolisme del glucògen, de la glucosa i dels lípids<sup>45</sup>.

Els inhibidors específics de la PDE5 (IPDE5s) com el sildenafil, tenen un ampli ventall d'aplicacions clíniques i d'entre elles, la més coneguda és el tractament de la disfunció erèctil<sup>46</sup>. Tanmateix, el seu ús també ha estat aprovat en pacients amb hipertensió arterial pulmonar (HAP), degut a la seva eficàcia en la reducció de la PA pulmonar (PAP), millorant la funció cardíaca i la capacitat d'exercici<sup>47</sup>. Recentment, s'estan portant a terme un gran nombre d'estudis clínics centrats en analitzar els possibles efectes beneficiosos de la inhibició de la PDE5 sobre la patologia cardiovascular<sup>48-50</sup>. Existeixen diversos estudis clínics on s'ha demostrat una millora de diferents paràmetres hemodinàmics i clínics en pacients amb insuficiència cardíaca crònica (ICC) amb els IPDE5s<sup>50-52</sup>. Alhora, la inhibició de PDE5 exerceix un efecte protector en la isquèmica-reperfusió<sup>53</sup> i la hipertròfia cardíaca patològica<sup>54</sup> mitjançant complexes cascades de senyalització cel·lular, entre les quals s'inclouen l'NO, la PKG, la calcineurina/NFAT i la quinasa PI3/Akt<sup>55</sup>. A més del seu efecte vasodilatador, s'ha demostrat que els IPDE5s tenen

efectes directes protectors sobre el miocardi a través de mecanismes encara no completament descrits. Se sap que en condicions fisiològiques, la presència de PDE5 al miocardi és mínima. Tanmateix, estudis clínics i estudis experimentals han observat que la seva expressió de PDE5 es troba incrementada en diferents situacions patològiques, com per exemple en miopaties cròniques amb hipertròfia ventricular<sup>56,57</sup>.

## 1.2. PATOLOGIA CARDIOVASCULAR

Al llarg dels últims dos segles, canvis tant importants com la revolució tecnològica i industrial així com la transformació econòmica i social i les grans millores en la condicions sanitàries, han provocat un canvi en la distribució general de les malalties amb més mortalitat i morbiditat a nivell mundial. Actualment, les MCVs han sorgit com la primera causa de mort dels països industrialment desenvolupats, juntament amb el càncer i la diabetis<sup>58</sup>. Cada any, moren més persones de MCVs que de qualsevol altra causa. S'estima que mundialment, al voltant de 17.5 milions de persones van morir de MCVs l'any 2012, corresponent a un 31% de la mortalitat global<sup>59</sup>. D'aquestes morts, s'estima que 7.4 milions van ser degudes a malalties coronàries i 6.7 milions van ser provocades per infart cerebral (ictus). Als Estats Units (EEUU), la taxa de morts atribuïbles a MCVs tot i haver disminuït en els darrers anys, encara es manté elevada. Concretament, l'any 2013, el 30.8% (800.937 morts) de la mortalitat total (2.596.993 morts) va ser deguda a MCVs<sup>60</sup>.

### 1.2.1. Remodelat patològic vascular

La paret vascular pot patir canvis en la seva estructura per tal de mantenir una mida de la llum de vas adequada per permetre el flux sanguini. Aquest procés s'anomena remodelat vascular<sup>61</sup>. L'habilitat de les artèries per adaptar-se en resposta a situacions fisiològiques és essencial per exemple durant l'embaràs o l'envelliment, però també és clau en diverses condicions patològiques com la hipertensió, l'aterosclerosi o la restenosi coronària després de l'implant d'*stents*. El procés de remodelat vascular és un procés actiu que involucra canvis a nivell de diversos processos cel·lulars com el creixement, la mort, la migració, l'organització del citoesquelet, així com de la síntesi i degradació de components de la MEC<sup>62-64</sup>. El remodelat vascular es pot activar a causa de la interacció entre diversos factors de creixement locals, citocines inflamatòries, substàncies vasoactives i estímuls hemodinàmics, i tots ells juguen un paper molt important en la modulació del procés. En funció de la regió arterial i de la patologia, podem trobar tres tipus de remodelat: el remodelat hipertròfic, amb un increment de la túnica mitjana i de l'àrea de la secció transversal; el remodelat eutròfic, amb reorganització estructural sense canvis en la secció transversal; i el remodelat hipotròfic, amb una disminució de l'àrea de

la secció transversal. A més, aquests tipus de remodelat es poden associar amb un increment (remodelat exterior) o una disminució del diàmetre de la llum del vas (remodelat interior).

### 1.2.1.1. Disfunció endotelial

En condicions fisiològiques l'endoteli manté el to vascular i regula el flux sanguini. Algunes senyals (p.e.: flux laminar i concentracions constants de factors de creixement) causen una activació estable de les CEs que mantenen el to vascular i unes condicions anticoagulants. Tot i així, factors de risc cardiovascular, com el tabaquisme, l'envelliment, l'obesitat, la hipercolesterolèmia, la hipertensió i la diabetis contribueixen a iniciar un procés d'inflamació crònica que va acompanyat d'una pèrdua de factors vasodilatadors i antitrombòtics endotelials, a la vegada que d'un increment dels factors vasoconstrictors i protrombòtics<sup>65-67</sup>. En aquesta situació de desequilibri, l'endoteli incrementa l'expressió de factors quimiotàctics leucocitaris, molècules d'adhesió i citocines inflamatòries. El procés inflamatori, l'empitjorament de la funció endotelial i el remodelat vascular del múscul llis i de la MEC, afavoreixen la formació de placa ateroscleròtica<sup>66,68</sup>.

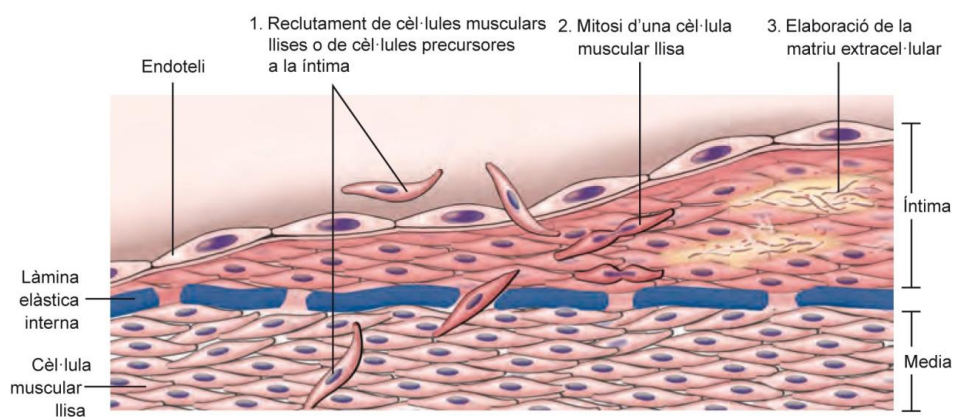
La fisiopatologia de la disfunció endotelial és complexa i involucra múltiples mecanismes. Un dels factors claus en la iniciació de la disfunció endotelial és l'NO. Quan la funció endotelial es troba alterada, hi ha una menor síntesi d'NO com a resultat d'una reducció de l'activitat de l'eNOS (causada per l'acció d'inhibidors endògens i exògens o per la reducció del substrat L-arginina) i, en conseqüència, es produeix una reducció de la biodisponibilitat de l'NO. Les espècies reactives de l'oxigen (ROS) es generen a partir de la reducció de molècules d'oxigen durant el metabolisme mitocondrial o com a resposta cel·lular a xenobiòtics, citocines i invasions bacterianes. La font principal de generació de ROS dels vasos és l'enzim NADPH-oxidasa, així com la xantina oxidasa i els mitocondris<sup>69</sup>. En situacions fisiològiques, el sistema de defensa antioxidant de l'organisme neutralitza els nivells de ROS, però quan la resposta oxidant es troba potenciada respecte a la resposta antioxidant, es produeix el que s'anomena estrès oxidatiu, que acaba promovent la disfunció endotelial. Tot i que existeixen diversos tipus de ROS, un dels principals ROS implicats en la disfunció endotelial és l'anió superòxid ( $O_2^-$ ), que té una gran afinitat pel NO. La reacció del  $O_2^-$  amb el NO forma el peroxinitrit, un oxidant citotòxic que té capacitat de nitrosilació de proteïnes, alterant la seva funció i promovent al mateix temps la disfunció endotelial<sup>70</sup>. Una altra conseqüència de l'elevació dels nivells de peroxinitrit és la degradació del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), necessari per la síntesi de NO per l'eNOS, donant lloc al seu desacoblament. En aquest estat, l'eNOS produeix anions superòxid, agreujant la situació de disfunció endotelial<sup>71,72</sup>. Finalment, els ROS també afavoreixen la inflamació de la paret vascular incrementant l'expressió de VCAM-1, ICAM-1 i molècules quimiotàctiques com el pèptid 1 quimiotàctic

de macròfags (MCP-1), que al mateix temps provoquen una disminució de la biodisponibilitat del NO, retroalimentant positivament el procés de disfunció endotelial<sup>73</sup>.

### 1.2.1.2. Alteració de les VSMCs

Les VSMCs tenen un paper fonamental en la reparació vascular tant en condicions fisiològiques com patològiques. Aquest tipus cel·lular té la capacitat de proliferar en resposta a estímuls concrets i sintetitzar components de la MEC (col·lagen, elastina o proteoglicans), així com alliberar factors de creixement i citocines.

La lesió de qualsevol tipus (infecció, inflamació, resposta immune, traumatisme físic, exposició a tòxics, etc.) de la paret d'un vas sanguini dóna lloc a una resposta estereotipada amb la finalitat de reparar-la<sup>74</sup> (Figura 13). Després de la lesió, les VSMCs migren a la túnica íntima del vas, on es transformen al fenotip sintetitzador i proliferen i sintetitzen MEC amb l'objectiu de reomplir la ferida formant una nova capa (neoíntima) (Figura 13). Amb el temps, es produeix un fenomen de normalització i les VSMCs presents a la neoíntima deixen de proliferar i adopten el fenotip contràctil. Tot i així, l'engruiximent de la túnica íntima pot arribar a ser permanent. En el cas que les senyals que activen aquest procés de reparació persisteixin o siguin de caràcter recurrent, es produirà un engruiximent excessiu d'aquesta capa, que pot arribar a produir estenosi (estretament de la llum del vas) de vasos petits o mitjans, implicant la correcta perfusió tissular.



**Figura 13. Resposta típica enfront una lesió vascular.** Augment del gruix de la túnica íntima amb migració de les cèl·lules musculars llises vasculares (VSMCs) i proliferació de les VSMCs dins de la íntima i la síntesi de la MEC. (Adaptat de: *Robbins. Patología humana. 8ª edició. Capítulo 10, pg 355. Editorial Elsevier Saunders*).

Tanmateix, la túnica íntima dels vasos no és la única que pot patir canvis en la seva estructura. La túnica mitjana també es pot veure afectada per diverses situacions fisiopatològiques, com l'envelliment. El gruix d'aquesta capa augmenta amb l'edat, i paral·lelament disminueix el número de VSMCs, amb una activació de fenòmens com

l'apoptosi o mort cel·lular programada<sup>75</sup>. Junt amb la mort de les VSMCs, també s'activa el procés de fibrosi o producció de col·lagen amb l'objectiu d'omplir els espais anteriorment ocupats per les VSMCs, disminuint en conseqüència el contingut relatiu d'elastina d'aquesta capa<sup>76,77</sup>. Progressivament també es poden observar zones de calcificació, i una alteració de l'estructura i organització de les làmines elàstiques, que passen a ser més rígides i queden envoltades pels dipòsits de calci, disminuint la seva continuïtat i provocant fractures o discontinuïtats entre les diferents làmines<sup>78</sup>. L'envelliment i la inflamació poden influir sobre diverses propietats de les VSMCs com la capacitat de migració, de respondre a citocines i factors de creixement, i de síntesi de components de la MEC<sup>79,80</sup>. Aquesta sèrie d'alteracions es tradueixen en un augment del gruix de la paret vascular i una alteració de la funció de les VSMCs, incrementant el risc de progressió a malaltia ateroscleròtica.

La plasticitat de les VSMCs es regula a nivell epigenètic. Els mecanismes epigenètics es poden dividir principalment en quatre categories en base al seu mecanisme d'acció: la metilació de l'ADN, les modificacions covalents de les histones, el remodelat de la cromatina dependent d'ATP i la regulació per ARNs no codificants, que inclou els micro ARNs (miARN o miRNA per les sigles en anglès). Recentment, diferents estudis han demostrat que els miARNs juguen un paper important en el control de la plasticitat de les VSMCs i la diferenciació i proliferació vascular<sup>81-85</sup>. Els miARNs són ARNs petits (19-25 nucleòtids) que regulen una gran varietat de processos biològics, com la proliferació i diferenciació cel·lular, a través del silenciament de l'àcid ribonucleic missatger (ARNm). Cada miARN regula la expressió de centenars de ARNm diana, els quals poden jugar un paper important en la homeòstasi o bé en la patogènesi a través de la regulació de múltiples gens.

### **1.2.1.3. Patologia vascular**

#### **Arteriosclerosi**

La paraula arteriosclerosi significa "enduriment de les artèries" i es defineix, en termes generals, com l'engruiximent de la paret i la pèrdua d'elasticitat arterial. L'arteriosclerosi afecta a artèries petites i arterioles, i pot donar lloc a una lesió isquèmica distal. La hipertensió està relacionada amb dues formes d'arteriosclerosi de vasos petits: l'arteriosclerosi hialina, amb un engruiximent de la paret degut al dipòsit de proteïnes i amb un estretament de la llum; i l'arteriosclerosi hiperplàsica, caracteritzada per un engruiximent de la paret amb capes concèntriques, i un estretament de la llum.

## Aterosclerosi

Una de la causa més important pel desenvolupament de MCV és l'aterosclerosi. L'aterosclerosi es caracteritza per lesions o plaques ateromatoses formades per un nucli lipídic tou de colesterol i èsters de colesterol recobert per una capa fibrosa i rígida que sobresurt a la llum vascular. La malaltia ateroescleròtica afecta principalment a les artèries elàstiques (p.ex., aorta, caròtida i artèries ilíques) i les artèries musculars de mida mitjana i grans (p.ex., artèries coronàries). La placa ateromatosa pot obstruir gradualment la llum vascular, de manera que el flux sanguini als òrgans més distals es veu compromès, provocant una lesió isquèmica. D'altra banda, la ruptura de la placa pot desencadenar la producció de coàguls que poden contribuir a l'obstrucció de la llum vascular. Les artèries que irriguen al cor, el cervell, els ronyons i les extremitats inferiors són les més afectades per aquesta malaltia, produint entre d'altres infart de miocardi, ictus, aneurismes aòrtics i malaltia vascular perifèrica, algunes de les causes més freqüents de morbiditat i mortalitat en el món occidental.

### Epidemiologia

La prevalença i la gravetat de l'aterosclerosi es relaciona amb diversos factors de risc tant constitucionals o no modificables (edat, sexe masculí, antecedents familiars, anomalies genètiques...), com adquirits, és a dir, relacionats amb el comportament i potencialment modificables (hiperlipèmia, hipertensió, tabaquisme...).

### Patogènesi

La aterosclerosi s'explica com una resposta inflamatòria crònica de la paret arterial a una lesió endotelial. Les causes de disfunció endotelial a l'inici de l'aterosclerosi no són completament conegudes, però es creu que diversos factors etiològics com el fum del tabac, agents infecciosos com citocines inflamatòries (p.ex.: factor de necrosi tumoral  $\alpha$  o TNF $\alpha$ ) poden estimular l'expressió de gens proaterogènics de les CEs. Tanmateix, les causes principals de disfunció endotelial són les alteracions hemodinàmiques, la hipercolesterolèmia i la inflamació.

La progressió de la lesió endotelial es troba modulada per interaccions de lipoproteïnes modificades, macròfags derivats dels monòcits, limfòcits T i les cèl·lules de la paret arterial. En primer lloc, l'endoteli esdevé adhesiu: la presència de molècules adhesives leucocitàries atrau als monòcits i limfòcits T cap a l'endoteli. Els monòcits penetren a través de la túnica íntima i es transformen en un tipus de macròfag anomenat cèl·lula espumosa (*foam cell*). La interacció entre els monòcits i els limfòcits T provoca canvis en la permeabilitat de l'endoteli, permetent l'entrada de lipoproteïnes dins de l'espai sub-endotelial de la túnica íntima. Aquests lípids s'oxiden a través de l'acció dels ROS

generats localment pels macròfags o per les CEs. Els macròfags s'encarreguen de digerir les proteïnes de baixa densitat (*low-density lipoprotein*, LDL) i les acumulen al seu interior, formant "estries de greix" a les plaques d'ateroma. A més, la LDL oxidada estimula l'alliberament de factors de creixement, citocines i quimiocines per part de les CEs i dels macròfags que incrementen el reclutament de monòcits a les lesions<sup>86</sup>.

La formació de l'ateroma també requereix la migració de VSMCs a la túnica íntima. La proliferació a la íntima de les VSMCs i el dipòsit de components de la MEC són essencials en la maduració de l'ateroma, ajudant a reforçar i estabilitzar la placa ateromatosa<sup>87</sup>. Les plaques generalment segueixen canviant i augmenten de mida progressivament. Sovint, els ateromes poden patir un procés de calcificació. Tanmateix, els principals canvis amb significació clínica són els següents:

- Ruptura, ulceració i erosió de la superfície luminal: exposa al torrent sanguini substàncies molt trombogèniques, induint la formació de coàguls. Aquests coàguls poden obstruir la llum de vas total o parcialment, provocant isquèmia distal a aquest punt.
- Hemorràgia de la placa: la ruptura de la capa fibrosa que la recobreix pot provocar una hemorràgia dins de la placa. L'hemorràgia continguda pot induir la ruptura de la placa o bé expandir el seu volum.
- Ateroembolisme: La ruptura de la placa allibera parts del seu contingut al torrent sanguini, causant microcoàguls.
- Formació d'aneurisma: La pressió induïda per l'aterosclerosi o per la pèrdua de teixit elàstic, produeix la debilitat de la paret de vas i la formació d'aneurismes (dilatació localitzada de la paret) amb risc de ruptura.

### 1.2.2. Remodelat patològic cardíac

El remodelat cardíac és un procés complex que engloba els canvis de la mida, composició i funció del cor, en resposta a un estímul fisiològic o patològic. Els miòcits cardíacs, els fibroblasts, els miofibroblasts, les cèl·lules del sistema immunitari i les CEs són els principals actors en el procés de remodelat cardíac.

#### 1.2.2.1. Hipertròfia cardíaca

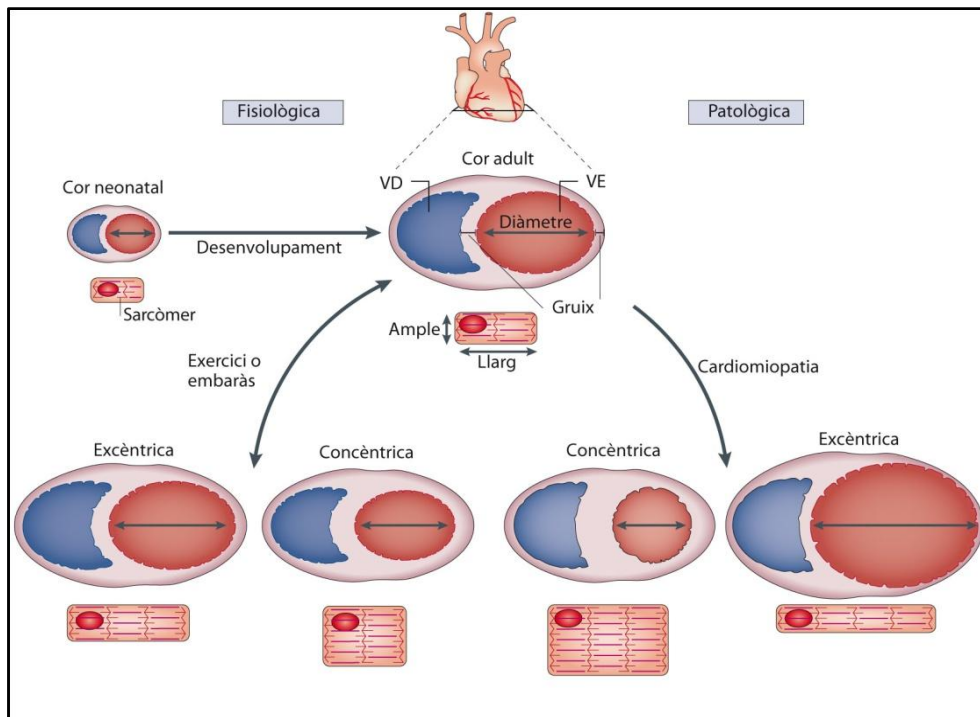
La hipertròfia cardíaca es defineix com un increment en la massa total del cor i es pot classificar com a fisiològica, quan està associada a una funció normal del cor, o bé patològica, associada a disfunció cardíaca. La hipertròfia fisiològica és una resposta a estímuls com l'embaràs<sup>88</sup> o l'exercici<sup>89</sup> i, en general, no es considera un factor de risc cardiovascular. Els canvis en l'increment de mida i massa del cor observats durant la

hipertròfia fisiològica van acompanyats d'un increment proporcional dels elements estructurals del miocardi (proteïnes de la MEC) i de canvis moleculars, bioquímics i metabòlics que permeten mantenir la funció cardíaca<sup>90</sup>.

En canvi, els factors que indueixen un remodelat cardíac patològic són variats i inclouen la hipertensió sistèmica o pulmonar, l'IAM, la malaltia arterial coronària, mutacions genètiques de gens que codifiquen per a proteïnes del sarcòmer, la cardiomiopatia diabètica o metabòlica, la miocarditis d'origen bacterià o víric, la insuficiència valvular i les cardiomiopaties congènites<sup>91</sup>. El procés d'hipertròfia patològica sol respondre a quadres de sobrecàrrega hemodinàmica sostinguda i persistent, i pot conduir al desenvolupament d'insuficiència cardíaca. La hipertròfia patològica se sol associar a mort cel·lular (apoptosi i/o necrosi) i un augment de fibrosi intersticial per tal de reemplaçar el teixit perdut.

La hipertrofia cardíaca es pot classificar, depenent de la geometria del cor, en hipertròfia excèntrica o concèntrica (Figura 14). La hipertrofia excèntrica fisiològica es desenvolupa degut a una sobrecàrrega de volum i es caracteritza per un augment tant de la llargada com de l'amplada dels miòcits, que provoca un increment del diàmetre intern dels ventricles proporcional a l'augment del gruix en la paret. La hipertròfia excèntrica patològica és causa d'un procés patològic com l'infart de miocardi o la cardiomiopatia dilatada, que provoquen una dilatació ventricular amb un creixement preferentment en la llargada dels miòcits. Per altra banda, en la hipertròfia concèntrica s'observa un increment del gruix de la paret associat a una reducció de les dimensions de la cavitat ventricular. En aquesta condició, els miòcits creixen més en amplada que en la seva llargada i generalment s'associa a patologies com la hipertensió o malalties valvulars, o alguns fenòmens fisiològics com l'exercici de predomini estàtic (hipertròfia concèntrica fisiològica).





**Figura 14. Classificació de la hipertròfia cardíaca.** La hipertròfia cardíaca es pot classificar segons el creixement excèntric o concèntric, en base a la geometria del cor i dels miòcits. A més, el cor pot adaptar-se a estímuls fisiològics (exercici o embaràs) o bé patològics (cardiomiopatia). VD: ventricle dret; VE: ventricle esquerre. (Adaptat de la referència <sup>92</sup>).

### Vies de senyalització cel·lular d'hipertròfia cardíaca

Es creu que els estímuls principals que promouen la hipertròfia cardíaca són l'estrès mecànic i les senyals neurohumorals, que activen diverses respostes a nivell cel·lular com l'expressió gènica, la síntesi de proteïnes, l'ensamblatge dels sarcòmers o el metabolisme cel·lular<sup>92,93</sup>. Les vies de senyalització i proteïnes responsables de la hipertròfia cardíaca són complexes i, tot i que l'evidència científica ha permès identificar diferents vies de senyalització cel·lulars activades per la hipertròfia fisiològica o patològica, existeix una ampla interacció entre elles. A més, els mecanismes que regulen la transició de la hipertròfia fisiològica a la hipertròfia patològica no es coneixen amb profunditat. La hipertròfia fisiològica del cor es pot activar a partir de senyals com la triiodotironina (hormona tiroidea, T3), el factor de creixement endotelial vascular B (VEGFB), la insulina i el factor de creixement tipus insulina 1 (IGF1). Per altra banda, les vies de senyalització neurohumorals modulades a través de receptors de membrana acoblats a proteïna Gq heterotrimèrica estan generalment associades a l'activació dels processos d'hipertròfia patològica<sup>94</sup>. En resposta a un estímul patològic, alguns factors vasoactius com l'Ang-II, ET-1 o la NA s'alliberen per tal de promoure el creixement cel·lular<sup>95,96</sup>.

### 1.2.2.2. Fibrosi cardíaca

La fibrosi miocàrdica és un marcador d'hipertrofia patològica i es caracteritza per una acumulació de col·lagen a la MEC del miocardi amb la finalitat de reparar un teixit després d'una lesió. La fibrosi es pot dividir, segons la seva causa i la seva localització anatòmica, entre fibrosi reactiva intersticial, fibrosi reparativa o fibrosi perivascular. En resposta a un increment de l'estrès mecànic de la paret, com la hipertensió, apareix la fibrosi reactiva intersticial<sup>97</sup>. Aquest tipus de fibrosi es localitza a la MEC, no va acompanyada de pèrdua de miòcits i es caracteritza per zones de fibrosi difusa. La fibrosi perivascular, que també s'associa a hipertensió, es caracteritza per una acumulació de col·lagen a la túnica adventícia de les artèries coronàries intramiocàrdiques<sup>98</sup>. Finalment, la fibrosi reparativa és un procés essencial per reemplaçar el teixit mort<sup>99</sup>. La mort de miòcits per necrosi degut a una reducció d'oxigen o bé per estímuls patològics com la producció de catecolamines, pot produir-se a nivell macroscòpic (p.ex: infart de miocardi) o a nivell microscòpic (observat en la malaltia hipertensiva). Com que els cardiomiòcits tenen una capacitat proliferativa limitada, no es poden reemplaçar després d'una lesió i, per tant, la formació d'una cicatriu de col·lagen és un mecanisme reparatiu per evitar la ruptura del miocardi. Aquest tipus de fibrosi també s'observa en altres patologies que, en última instància afecten a la viabilitat dels miòcits cardíacs, com per exemple en cardiomiopaties i malalties valvulars, resultant en una fibrosi dispersa del miocardi.

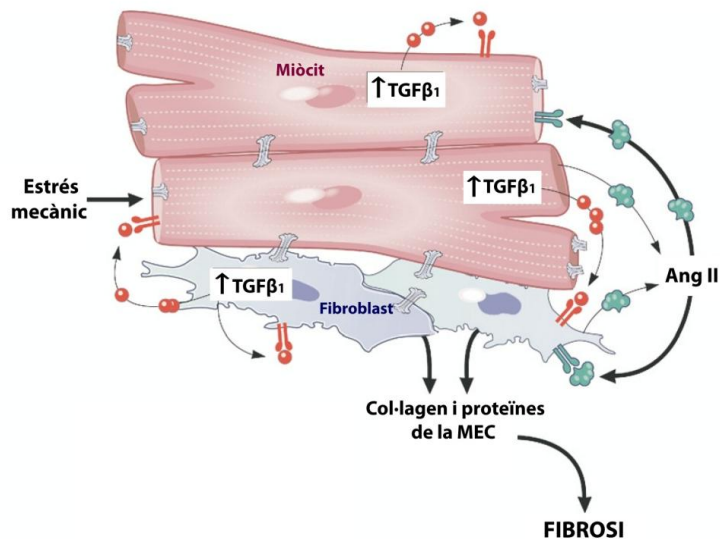
#### Els miofibroblasts

Els miofibroblasts o fibroblasts activats s'acumulen a les zones del cor on hi ha una lesió. Tenen propietats similars a les VSMCs, com la formació de fibres d'estrès contràctils, i la presència d'un reticle endoplàsmic més gran, necessari per la funció sintetitzadora. L'activació dels miofibroblasts així com la seva proliferació i supervivència es troba modulada per una varietat de factors solubles i físics de l'entorn, com les citocines: interleuquines (IL-1 i IL-13), TGF- $\beta$ 1 i TNF $\alpha$ ; factors de creixement: factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), factor de creixement de teixit connectiu (CTGF) i factors de la MEC: estrès mecànic i rigidesa<sup>100-103</sup>.

El TGF- $\beta$ 1 és un dels principals activadors de la transició de fibroblasts a miofibroblasts<sup>104</sup>. El TGF- $\beta$ 1 produeix els seus efectes un cop s'ha unit al seu receptor dimeritzat (T $\beta$ RI i T $\beta$ RII) localitzat a l'espai extracel·lular. La unió lligand-receptor resulta en l'activació d'una cascada de reaccions de fosforilació al final de les quals, les proteïnes Smad 2, 3 i 4 es trasloquen al nucli on regulen l'expressió de gens relacionats amb el procés de fibrogènesi (p.ex.: CTGF, periostina, col·lagen, ET-1...). L'expressió d'aquests gens es tradueix finalment en la síntesi i secreció de proteïnes a la MEC. Un dels estímuls principals de la producció de TGF- $\beta$ 1 per part dels fibroblasts és l'Ang-II<sup>105,106</sup>.

Com ja s'ha vist anteriorment, l'Ang-II estimula l'hipertrofia dels cardiomiòcits alhora que modula l'expressió de TGF- $\beta$ 1 als fibroblasts cardíacs, incrementant la síntesi de col·lagen (Figura 15).

**Figura 15. Comunicació cel·lular entre miòcits i fibroblasts.** Representació esquemàtica dels mecanismes autocrins i paracrins que potencien els efectes produïts pels estímuls de l'estrès mecànic i de l'Ang-II en el procés de fibrosi miocàrdica. (Adaptat de referència <sup>107</sup>).



### Conseqüències de la fibrosi cardíaca sobre la funció cardíaca

L'aparició de fibrosi cardíaca té múltiples conseqüències adverses. Tot i que en condicions normals existeix una variabilitat en la mida dels miòcits (heterogeneïtat), en situacions patològiques s'accentua degut a la presència de fibres de col·lagen envoltant els miòcits. D'altra banda, el dipòsit de col·lagen fibril·lar tipus I, per les seves propietats de rigidesa, contribueix a disminuir l'elasticitat del teixit miocàrdic. L'impacte negatiu d'aquest augment de rigidesa mecànica del cor sobre la funció diastòlica o capacitat d'ompliment del cor, ha estat descrit en diversos estudis tan clínics com experimentals<sup>108</sup>. Finalment, l'acumulació de proteïnes de la MEC que acompanya la fibrosi cardíaca i la presència de miofibroblasts, pot donar lloc a un remodelat elèctric i una major arritmogènesi, tant ventricular com auricular<sup>109,110</sup>. La MEC entre d'altres funcions, permet la comunicació entre cèl·lules veïnes, necessària per la transmissió de l'impuls elèctric. L'acumulació desproporcionada de col·lagen a la MEC durant el remodelat patològic obstaculitza la conducció elèctrica del cor, promovent el desenvolupament d'arítmies. La fibrosi distribuïda de forma heterogènia i difusa o de forma localitzada representa la base fisiopatològica de la generació d'alguns tipus de reentrades<sup>111</sup>. A més, estudis recents demostren, a més, que els fibroblasts no són neutres elèctricament, sinó que també condicionen les propietats elèctriques del teixit miocàrdic *in vivo*. En conseqüència, els canvis que ocorren en els fibroblasts activats poden incrementar l'arritmogenicitat directament a través de l'alteració de les propietats elèctriques del miocardi<sup>110,112</sup>.

El cor és un òrgan que requereix un proveïment d'oxigen de forma continuada per tal de mantenir les necessitats energètiques. Les arterioles coronàries són les responsables del proveïment d'oxigen suficient als miòcits. La túnica adventícia d'aquests vasos i els miofibroblasts que la conformen participen en la modulació del to vascular. La presència de fibrosi perivascular a les artèries coronàries i arterioles, acompanyat d'un augment del gruix de la túnica media i la presència de miofibroblasts a la túnica adventícia, contribueixen a que la llum del vas sigui més estreta i, per tant, el flux sanguini i en conseqüència el proveïment d'oxigen es trobi limitat, amenaçant la supervivència dels cardiomiòcits<sup>113,114</sup>.

### 1.2.2.3. Patologia cardíaca

#### Fibril·lació auricular

La fibril·lació auricular (FA) és l'arítmia cardíaca sostinguda més freqüent. En la població general, la FA té una prevalença del 0.4-1% en pacients més joves de 40 anys i del 5% en pacients majors de 65 anys. En la FA, les senyals elèctriques del cor no es transmeten de manera normal sinó de manera ràpida i caòtica a l'interior de les aurícules, provocant una contracció molt ràpida i desordenada de les mateixes (fibril·lació). Això és degut principalment a que les senyals elèctriques s'inicien en zones properes a les venes pulmonars enlloc d'iniciar-se al node SA. Aquestes senyals elèctriques defectuoses arriben al node AV de manera constant i això causa una contracció ràpida dels ventricles. Tot i així, el node AV actua com a filtre d'aquestes senyals, de manera que es produeix una pèrdua de la sincronia entre l'activitat elèctrica i contràctil entre les aurícules i els ventricles. Aquest fet genera que el ritme cardíac sigui irregular. En la FA, els ventricles poden arribar a contraure a un ritme de 100-175 batecs/minut, ritme superior al normal (60-100 batecs/min). En conseqüència, els ventricles expulsen la sang a l'organisme de manera poc eficient, incrementant el risc de desenvolupar insuficiència cardíaca. En l'ECG, la FA produeix una absència de l'ona P, degut a que les aurícules no tenen una activitat elèctrica normal i no es contrauen i s'observa un ritme ventricular (QRS) molt irregular (Figura 16).

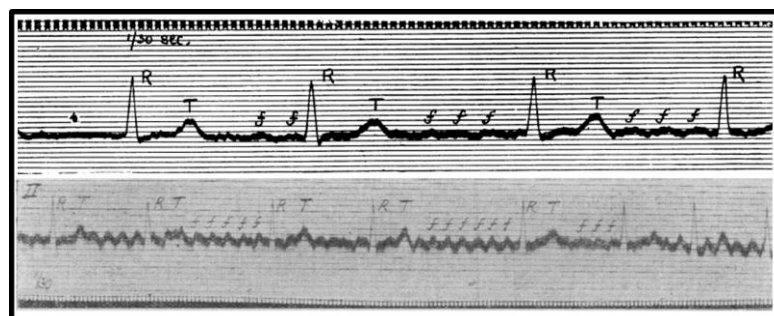


Figura 16. Dos dels primers ECG registrats en pacients amb FA. Reproduït de Leewis T.<sup>115,116</sup>.

En general, la FA apareix en persones amb una MCV de base, com hipertensió arterial, malalties valvulars o cardiopatia isquèmica<sup>117</sup>. També pot aparèixer per alteracions de la glàndula tiroide o altres malalties hormonals (Figura 17). Però el factor demogràfic més important que incrementa el risc de FA és l'edat avançada. Tanmateix, una persona sana i que segueixi un estil de vida saludable també pot desenvolupar FA. La causa en aquests casos sol ser genètica, la qual té un paper cada vegada més reconegut<sup>118</sup>. Finalment, el 10% dels pacients amb FA no presenten una MCV subjacent, i es classifiquen com a FA aïllada.

Diferents estudis han apuntat a altres factors que també podrien contribuir a incrementar el risc de FA. Entre aquests factors de risc hi ha el consum d'alcohol i de tabac i les apnees del son (Figura 17). En el cas de l'alcohol, un consum elevat ( $\geq 36$  g/dia), està associat a un risc ajustat de patir FA (HR, *Hazard Ratio*) de 1.34-1.46<sup>119,120</sup>. El tabac també es relaciona amb el desenvolupament de FA seguint un efecte dosi-depenent, independent del risc de desenvolupar una cardiopatia, és a dir, a més quantitats de cigarretes fumades, existeix un risc més alt de patir FA<sup>121,122</sup>. S'ha demostrat que els pacients amb FA tenen una elevada prevalença de la síndrome de l'apnea obstructiva del son (SAOS, 32-49%). La SAOS ha demostrat ser un factor de risc independent de FA<sup>123-125</sup>. Concretament, els pacients amb SAOS tenen un risc de desenvolupar FA 4 vegades més alt que els individus sans<sup>126</sup> i s'associa a una recurrència de FA més elevada després de cardioversió i ablació<sup>127</sup>. Finalment, un dels factors emergents que recentment ha sigut reconegut com a promotor de FA és la pràctica continuada d'exercici de resistència d'alta intensitat, demostrat en diversos estudis clínics i epidemiològics<sup>128-131</sup>.

### **Fisiopatologia de la FA**

La fisiopatologia de la FA es caracteritza per un remodelat estructural, elèctric i autonòmic de les aurícules<sup>132</sup> que acaba desencadenant a una activitat elèctrica desorganitzada<sup>133</sup> (Figura 17). La severitat de la FA està modulada per diversos mecanismes que inclouen alteracions hemodinàmiques, estrès mecànic, canvis hormonals, canvis en els factors de creixement i la participació de citocines inflamatòries<sup>133</sup>, tots ells amb efectes directes sobre el remodelat auricular.

El remodelat estructural associat a la FA, és a dir, els canvis en la morfologia i estructura del miocardi, es caracteritza per la dilatació auricular i la fibrosi miocàrdica. Com ja s'ha comentat anteriorment, l'acumulació de col·lagen extracel·lular pot interferir en la normal conducció de l'estímul elèctric dins del miocardi. L'increment de la fibrosi a les aurícules provoca una reducció de la velocitat de conducció en el miocardi de forma desigual i heterogènia entre les diferents zones de l'aurícula<sup>134</sup>. El desenvolupament de fibrosi

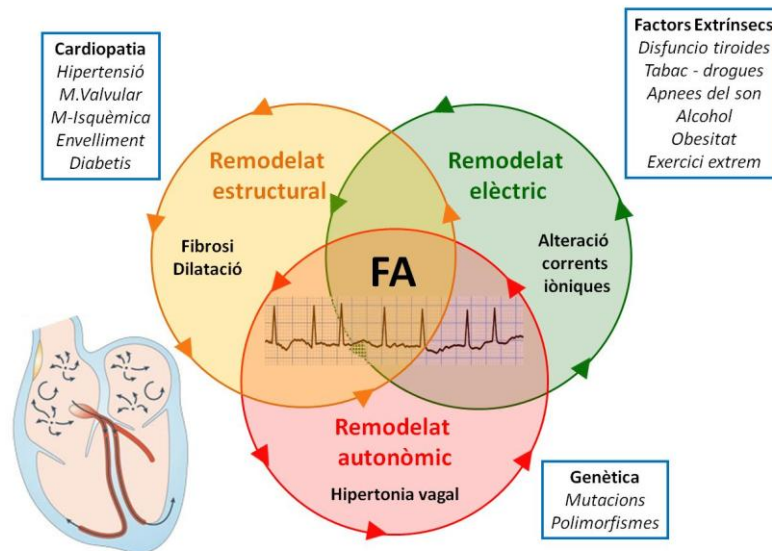
auricular és la característica principal del remodelat estructural en la FA, i es considera un substrat central en la perpetuació de la FA<sup>133</sup>. A més, la fibrosi ventricular es creu que també contribueix de manera substancial a promoure insuficiència cardíaca associada a la FA<sup>135</sup> (Figura 17). Per altra banda, la dilatació auricular és una característica comuna en models de FA, juntament amb la presència de fibrosi o els trastorns elèctrics<sup>136</sup>, incrementant l'estabilitat de les reentrades i el seu manteniment<sup>137</sup>.

El remodelat elèctric de les aurícules es basa en els canvis en l'excitabilitat i el PAc del miòcits. Canvis en la expressió o en la regulació post-traducciona de canals iònics poden desencadenar FA<sup>138</sup>. Aquests canvis contribueixen a un escurçament del PAc i del període refractari del teixit miocàrdic, afavorint les reentrades i allargant la conducció de l'activitat elèctrica<sup>138</sup>. A més, altres factors relacionats amb l'entorn dels miòcits auriculars (*shear stress*, factors metabòlics, etc.) poden influenciar la regulació de l'expressió de canals iònics a la seva membrana<sup>139</sup>.

El sistema nerviós autonòmic regula estretament la funció de l'aurícula. Canvis en el to simpàtic o parasimpàtic poden alterar el PAc auricular i el període refractari, causant despolaritzacions i desencadenant l'activitat elèctrica a les aurícules. Un terç dels pacients amb FA paroxística (episodis recurrents que finalitzen espontàniament), i un 70% dels pacients joves, presenten com a disparadors de FA alteracions adrenèrgiques o vagals<sup>125140</sup>. En models animals, una baixa estimulació del to vagal (parasimpàtic) redueix l'aparició de FA a través de la disminució de la resposta simpàtica i parasimpàtica al cor<sup>141</sup>. Tanmateix, l'activitat parasimpàtica té una capacitat arritmogènica superior a l'activitat simpàtica, degut a un efecte més heterogeni que incrementa el risc de formació de reentrades<sup>142</sup>.

### **Mortalitat i morbiditat per FA**

La FA és una causa molt important de morbi-mortalitat<sup>143</sup>. Aquesta arítmia freqüentment està associada a un major risc de patir cardiomiopaties que, a llarg termini, poden conduir a insuficiència cardíaca<sup>144</sup> i a una reducció global de la qualitat de vida a causa de la símptomatologia que l'acompanya (palpitacions, cansament, dolor al pit...). La FA també és un contribuïdor independent per la demència i la disfunció cognitiva<sup>145</sup>. Tanmateix, el trombo-embolisme cerebral és una de les complicacions més freqüents associades a la FA. Els pacients amb FA no tractats tenen un increment del risc d'accident vascular cerebral (AVC) de fins a cinc vegades superior a la població sense FA<sup>146</sup>. En global, els pacients amb FA tenen un menor supervivència, amb un risc de mortalitat ajustada per factors de risc cardiovasculars, entre 1.5 to 1.9 més elevat<sup>147</sup>.



**Figura 17. Factors promotors de FA.** Esquema representatiu dels factors que contribueixen a l'aparició de fibril·lació auricular (FA). El remodelat estructural es caracteritza per un increment de la fibrosi i de la dilatació de les aurícules. El remodelat elèctric consisteix en una alteració de les corrents iòniques en els miòcits. El remodelat autonòmic consisteix en canvis del to vagal o simpàtic. Altres factors contribueixen a l'establiment de FA, com cardiopaties, factors genètics i factors extrasínsecs.

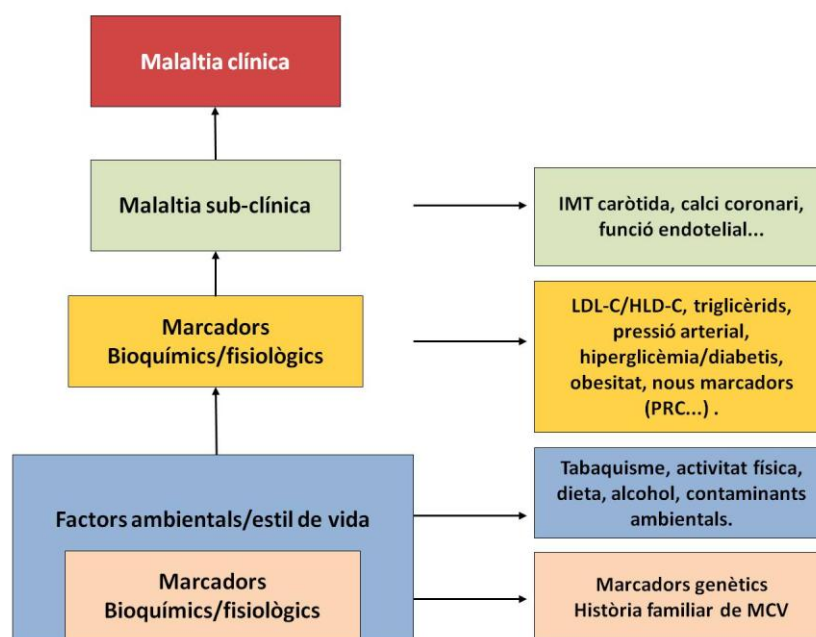
### 1.3. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR TRADICIONALS

El concepte de factor de risc cardiovascular va ser introduït per primera vegada l'any 1948 al *Framingham Heart Study*<sup>148</sup>, un estudi prospectiu que associava la presència d'antecedents específics amb l'aparició d'esdeveniments cardiovasculars adversos en el futur<sup>148</sup>. Aquest estudi es centrava en l'estudi de la malaltia ateroscleròtica (p.ex.: malaltia coronària cardíaca i ictus) i la malaltia hipertensiva i ha comptat amb la participació de fins a tres cohorts i que han portat a l'identificació dels principals factors de risc per a MCV. Entre aquests factors de risc identificats en aquest estudi, la majoria són factors de risc coneguts per a FA (edat avançada, diabetis, hipertensió, ICC, IAM, etc,...). De fet, entre els articles publicats basats en la cohort original del *Framingham Heart Study*, la FA es va associar a un increment del risc de mortalitat d'entre 1.5-1.9 vegades després de ser ajustat pels factors de risc cardiovascular preexistents<sup>147</sup>.

En l'actualitat, la definició de factor de risc es refereix a una característica mesurable que té una relació causal amb un increment de la freqüència d'una malaltia i constitueix un factor predictiu independent i significatiu del risc de contraure una malaltia. El *Framingham* i altres estudis epidemiològics han contribuït a la identificació d'altres factors de risc que actualment s'inclouen dins dels factors de risc tradicionals per a MCV. Els factors de risc cardiovascular es poden classificar de moltes maneres. En la figura 18 s'observa el curs natural de les MCVs i les característiques tant d'estil de vida o ambientals com bioquímiques o fisiològiques considerades factors de risc per aquestes

malalties, així com també marcadors de malaltia subclínica. D'entre els factors de risc tradicionals, la contribució més alta de morts per MCV s'atribueix a la hipertensió arterial, amb un 13% del global de morts atribuïbles, seguit del tabaquisme (9%), dels nivells alts de glucosa (6%), del sedentarisme (6%) i del sobrepès i l'obesitat (5%)<sup>149</sup>.

En els darrers anys, la Societat Europea de Cardiologia i d'altres societats i associacions mèdiques han publicat un gran nombre de guies per a la prevenció de MCVs. Aquestes guies recomanen l'avaluació del risc de MCV total o risc cardiovascular, ja que en la majoria de persones, equival al producte d'un número de factors de risc. La majoria de guies utilitzen sistemes d'estimació basats bé en el *Framingham Risk Score* o el sistema SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation Project*)<sup>150</sup>. Models convencionals de predicció, com el *Framingham Risk Score*, un algoritme utilitzat per estimar el risc cardiovascular a 10 anys d'un individu aconsegueixen una capacitat de predicció moderada utilitzant la informació sobre uns pocs factors de risc com l'edat, el sexe, la hipertensió, els nivells de colesterol i el tabaquisme. De fet, les guies europees actuals recomanen l'ús del sistema SCORE en la pràctica clínica per a establir el risc cardiovascular, perquè es basa en estudis de cohorts europees grans i representatives. Les taules de risc com l'SCORE faciliten l'estimació del risc CV en persones aparentment sanes, sense signes clínics o amb signes pre-clínics de malaltia. A més, la classificació SCORE permet separar entre regions europees de baix i alt risc a Europa tot i presentar els mateixos factors de risc<sup>150</sup>.



**Figura 18. Història natural de les MCV i classificació dels factors de risc.** MCV: malaltia cardiovascular; PRC: proteïna reactiva C, LDL-C; low-density lipoprotein cholesterol; HLD-C: high-density lipoprotein cholesterol; IMT: intima-media thickness. (Adaptat de referència <sup>151</sup>).



## 1.4. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR EMERGENTS

Tot i que els factors de risc cardiovascular tradicionals tenen una forta associació amb les MCVs, són insuficients per identificar el risc absolut total, i expliquen al voltant del 75%-90% del total d'incidència de MCV. En la recerca de nous factors de risc, durant els últims 10 anys s'han identificat diversos marcadors de risc no tradicionals per l'aterosclerosi. Aquests marcadors, associats a un risc més elevat de malaltia vascular<sup>152</sup>, corresponen a marcadors de metabolisme de lipoproteïnes (lipoproteïna), de disfunció endotelial (homocisteïna), d'homeòstasi (fibrinogen) i d'inflamació (proteïna reactiva C). La identificació de nous factors de risc per a MCV és molt important per a la recerca de noves vies relacionades amb el procés patològic cardiovascular. Dins dels factors emergents que poden promoure la patologia cardiovascular, aquesta tesi s'ha centrat en l'estudi de l'exercici físic de resistència d'alta intensitat i la SAOS.

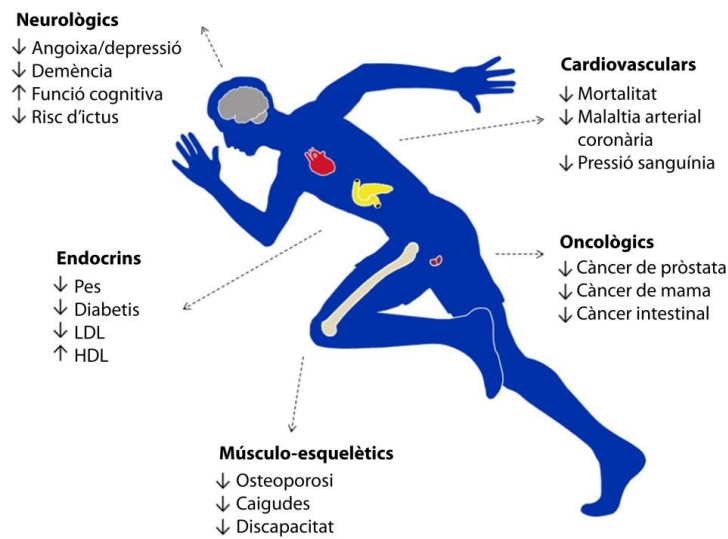
## EXERCICI FÍSIC I PATOLOGIA CARDIOVASCULAR

### 1.4.1. Beneficis generals de l'exercici físic

L'activitat física es defineix com a qualsevol moviment corporal produït pels músculs esquelètics que resulta en un consum d'energia significativament superior al nivell de consum energètic en repòs. D'altra banda, l'exercici o entrenament físic, es defineix com una execució sistemàtica d'una activitat física amb algun propòsit específic. Finalment, la capacitat física o capacitat funcional individual són el conjunt de qualitats físiques que permeten a una persona realitzar una activitat física com la capacitat cardiorespiratòria, la força muscular, la resistència física, la flexibilitat o la constitució corporal<sup>153</sup> i depenen, en gran part, de l'entrenament previ de cada individu.

L'activitat física regular és una peça clau en la promoció de la salut i el benestar de les persones a qualsevol edat, reduint notablement el risc de MCV i de mortalitat i millorant la qualitat de vida<sup>154-156</sup>. Molts estudis observacionals en humans han demostrat que la pràctica d'activitat física durant el temps lliure redueix el risc cardiovascular i la mortalitat per MCV tant en homes com en dones de qualsevol edat<sup>157,158</sup>. Entre d'altres efectes beneficiosos, l'exercici físic ajuda a perdre pes, redueix el nivell de colesterol total i de colesterol LDL, i augmenta els nivells de colesterol HDL (*high-density lipoprotein*)<sup>159,160</sup>, contribuint a la reducció de factors de risc cardiovascular. En pacients amb diabetis, la pràctica d'exercici augmenta la sensibilitat a la insulina<sup>161,162</sup>. L'exercici també té efectes directes protectors de risc cardiovascular, com la millora de la funció endotelial<sup>163</sup>, una reducció de la inflamació sistèmica<sup>164</sup>, efectes anti-trombòtics i efectes anti-plaquetaris<sup>165</sup>. A part dels beneficis cardiovasculars, l'exercici també millora la funció del múscul

esquelètic, la funció neurològica<sup>166</sup>, redueix el risc de càncer colorectal, de pròstata, i de mama<sup>167</sup> i millora la densitat òssia<sup>168</sup> (Figura 19).



**Figura 19. Beneficis sobre la salut de la pràctica d'activitat física.** HDL: *high-density lipoprotein*; LDL: *low-density lipoprotein*. (Adaptat de referència <sup>169</sup>).

## Tipus d'exercici

L'exercici es divideix de manera general en dos subgrups: l'exercici isotònic (dinàmic) i l'exercici isomètric (estàtic)<sup>170</sup>. L'exercici isotònic implica la contracció i relaxació rítmica (cicles d'estirament i escurçament) d'un gran nombre de músculs durant un període de temps llarg, activant el flux sanguini cap als músculs de treball més actius durant la relaxació, i augmentant el retorn venós cap al cor des dels músculs durant la contracció<sup>171</sup>. Aquest tipus d'exercici exigeix una demanada continua d'oxigen (metabolisme aeròbic) utilitzant com a font principal d'energia (ATP, adenosina trifosfat) els greixos i els carbohidrats<sup>172</sup>. D'altra banda, durant l'exercici isomètric els músculs no es veuen sotmesos a canvis d'estirament i escurçament, sinó que generen una contracció durant un període de temps curt, sense moviments d'articulacions. En aquest cas, el flux sanguini es veu restringit durant el període de contracció, augmentant la resistència perifèrica, la Pas i la Pad i provocant canvis petits en el VS. Durant aquests tipus d'exercici, de duració curta i alta intensitat, es necessita un subministrament d'energia ràpid i immediat. Per tal d'obtenir aquesta energia en forma d'ATP, s'utilitza el glicogen intramuscular per fosforil·lar l'adenosina difosfat (ADP) durant la glicòlisi anaeròbia, formant àcid làctic (metabolisme anaeròbic)<sup>173</sup>. Cal remarcar però que la majoria de disciplines esportives inclouen una combinació d'exercicis amb component isotònic i exercicis amb component isomètric.

En la pràctica clínica, l'exercici generalment es classifica en dos subgrups més amplis: l'exercici de resistència/aeròbic (p.ex. caminar, practicar futbol, la natació o anar amb bicicleta), o l'exercici de força/anaeròbic (l'aixecament de pesos)<sup>170</sup>. La pràctica regular d'exercici de resistència resulta en una millora de la capacitat funcional, permetent a llarg termini un entrenament més llarg a un ritme més alt<sup>174</sup>. D'altra banda, la pràctica regular d'exercici de força ajuda a tonificar i a augmentar la massa muscular<sup>171</sup>.

### **Dosi d'exercici**

La quantificació de l'exercici es pot definir amb el concepte de dosi o càrrega. La dosi d'exercici es pot interpretar com el producte d'activitat física realitzada en funció de la seva duració, freqüència i intensitat. La duració reflecteix la quantitat d'exercici acumulada en una sessió d'entrenament. La freqüència es defineix com el número de sessions d'entrenaments al llarg d'un període temps (dies, setmanes, mesos...). En resum, aquests dos paràmetres reflecteixen la quantitat de temps dedicada a l'exercici durant un període de temps determinat. Per altra banda, la intensitat de l'exercici es pot quantificar de manera relativa com una funció del percentatge de la capacitat màxima mesurable o, en termes absoluts, com la despesa metabòlica d'una sessió d'entrenament<sup>175</sup>. La intensitat relativa de l'exercici té en compte la capacitat física individual i utilitza com a mesura un paràmetre fisiològic com per exemple la FC o el consum d'oxigen. Aquestes mesures dependen de les adaptacions individuals a l'exercici i la capacitat per transportar oxigen a la musculatura activa. Així doncs, un exercici realitzat a una intensitat relativa al 75% del consum màxim d'oxigen ( $VO_2$  max) pot ser per exemple caminar a una velocitat de 4 km/h per una persona amb una patologia cardiovascular, o bé córrer a una velocitat de 12 km/h per un atleta professional<sup>176</sup>. En aquest cas el  $VO_2$  max es defineix com el ritme més alt del consum d'oxigen assolible durant la realització d'exercicis màxims o esgotadors. L'ús de la intensitat relativa d'exercici s'utilitza preferentment en la prescripció d'exercici durant la pràctica clínica o bé en estudis observacionals o d'intervenció, i requereix la determinació acurada del paràmetre màxim escollit sota valoració mèdica.

D'altra banda, l'ús de la intensitat absoluta en equivalents metabòlics (METS, ml/kg/min) és més freqüent en estudis observacionals que inclouen poblacions grans, tot i que té la limitació que no té en compte la capacitat física individual. El concepte de MET representa l'energia requerida per a realitzar una activitat física, i es calcula com un múltiple de la despesa metabòlica en repòs: una unitat de MET equival a l'oxigen consumit mentre una persona està asseguda, és a dir, 3.5 ml d' $O_2$ /kg de pes/min. Així doncs, de manera orientativa, una activitat moderada equival a 3.0-6.0 METS i correspon a la pràctica d'esports no competitiu com el golf, la pesca, la navegació, així com per exemple caminar a pas lleuger. Una activitat intensa o vigorosa equivalent a >6.0 METS,

seria per exemple la pràctica a nivell competitiu d'esports com córrer (*running, jogging*), el ciclisme, l'esquí de fons, la natació o el futbol<sup>177</sup> (Taula 1). Les activitats més intenses realitzades durant un temps específic a una freqüència determinada, generen una despesa energètica superior a les activitats d'intensitat moderada practicades durant el mateix temps i a la mateixa freqüència<sup>177</sup>. Aquest estimador resulta molt útil per mesurar la dosi d'exercici acumulada multiplicant la intensitat per la duració i la freqüència. D'aquesta manera el valor es tradueix a una dosi d'exercici total expressada en MET/h/setmana o MET/min/setmana. Aquests valors s'usen de forma comú en estudis epidemiològics perquè resulten fàcilment extrapolables a partir d'autoavaluacions sobre patrons d'activitat física individual.

**Taula 1. Diferents activitats físiques classificades segons la seva intensitat.** La classificació es basa en intensitats absolutes mesurades en MET (moderada o vigorosa/alta). (Adaptada de referència <sup>177</sup>).

Intensitat moderada (3.0-6.0 MET)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caminar a pas lleuger</li> <li>• Feines domèstiques</li> <li>• Aeròbic aquàtic</li> <li>• Bicicleta (menys de 16 km/h)</li> <li>• Tennis (dobles)</li> <li>• Balls de saló</li> <li>• Jardineria</li> </ul>
Intensitat vigorosa/alta (>6.0 MET)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Running, jogging</i></li> <li>• Natació ràpida</li> <li>• Tennis (individual)</li> <li>• Aeròbic</li> <li>• Bicicleta (16 km/h o més)</li> <li>• Jocs i esports competitius: fútbol, hockey, volleyball, bàsquet, esquí de fons...</li> <li>• Desplaçament de càrregues pesades (&gt;20 kg)</li> </ul>

Diferents societats mèdiques tant americanes com europees desenvolupen periòdicament guies amb les recomanacions sobre la dosi mínima d'activitat física necessària per obtenir beneficis sobre la salut cardiovascular. Segons aquestes guies en persones adultes es recomana una pràctica d'activitat física regular definida com a 30 min d'activitat física moderada un mínim de 5 vegades per setmana (450-500 METS/min/setmana aproximadament) o bé la pràctica de 20 min d'activitat vigorosa o intensa un mínim de 3 vegades per setmana (500-1000 METS/min/setmana)<sup>178-182</sup>.

La dosi mínima efectiva d'activitat física per obtenir beneficis per la salut ha estat investigada en diferents estudis. En un estudi realitzat a Taiwan, els autors van demostrar

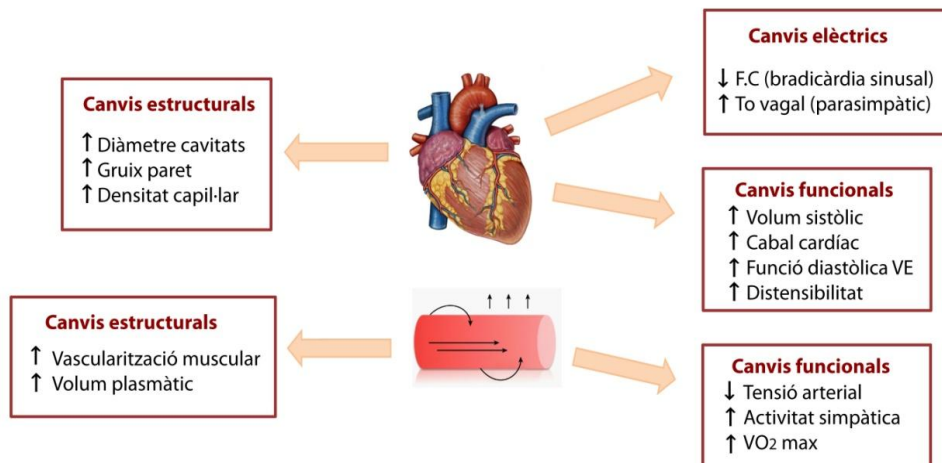
que aquells individus que practicaven una activitat física d'intensitat moderada durant 15 minuts diaris tenien un risc de mortalitat de qualsevol causa inferior en comparació amb els individus sedentaris i s'estimava que això representava un increment de 3 anys en la seva esperança de vida<sup>183</sup>. A més, 15 min addicionals d'exercici estaven s'associaven a una disminució de la mortalitat del 4% al llarg de 13 anys<sup>183</sup>. En cohorts americanes i europees es van trobar resultats molt similars: aquells individus que practicaven activitat física a una dosi 3 a 5 vegades superior a la recomanada, demostraven tenir els índexs de mortalitat més baixos en els següents 14.2 anys<sup>184</sup>. L'*Aerobics Center Longitudinal Study* va fer un seguiment durant 15 anys a corredors i va demostrar que córrer de 5 a 10 minuts diàriament estava associat a una reducció de la mortalitat cardiovascular de qualsevol causa<sup>185</sup>. Un anàlisi més global realitzat en 6 estudis de cohorts americanes i europees va reforçar aquests resultats, observant que els individus que practicaven activitats físiques per sota de les dosis recomanades per les guies clíniques, tenien un risc de mortalitat inferior en comparació amb els individus sedentaris<sup>178</sup>.

Així doncs, la pràctica d'activitat física, encara que sigui per sota de les recomanacions mínimes, repercuteix positivament en la nostra salut cardiovascular. Per tant, de manera intuïtiva, un increment petit sobre aquests nivells sembla que estaria associat a més beneficis per la salut, seguint una relació lineal. Tanmateix, fins al moment cap guia clínica no ha definit el límit o la dosi màxima efectiva en la qual es produeix un efecte màxim en la obtenció dels beneficis cardiovasculars amb la pràctica d'activitat física.

### **1.4.2. Adaptació fisiològica a l'exercici de resistència**

L'entrenament o exercici físic continuat indueix una sèrie d'adaptacions fisiològiques, morfològiques i funcionals, del sistema cardiovascular que poden variar segons la influència de factors tant constitucionals (superfície corporal, sexe, edat, factors genètics), com externs (intensitat, duració, freqüència, tipus d'exercici). En l'exercici de resistència/aeròbic el sistema cardiovascular ha de mantenir un CC elevat durant un període llarg de temps i, per tant, les adaptacions fisiològiques tindran com a objectiu augmentar la capacitat de transportar O<sub>2</sub> a la musculatura activa, tant a través del CC (adaptació central), com de la capacitat dels vasos per acollir una major quantitat de sang circulant (adaptació perifèrica). La figura 20 mostra un resum esquemàtic de les principals adaptacions cardiovasculars a l'exercici de resistència.

## Adaptació fisiològica a l'exercici de resistència



**Figura 20. Adaptació fisiològica cardiovascular a l'exercici de resistència.** Canvis estructurals, elèctrics i funcionals cardíacs i vasculars com a resposta a l'exercici de resistència.

### Adaptació central (cardíaca): 'El cor d'atleta'

Les principals adaptacions cardíques dels esportistes de resistència es poden resumir en els següents punts:

#### Bradicàrdia sinusal

La disminució de la FC o bradicàrdia sinusal, tant en repòs com durant l'exercici físic a una intensitat submàxima, és una característica principal dels atletes. A partir de la segona setmana d'entrenament de resistència ja es pot apreciar una moderada reducció de la FC. Tanmateix el quadre típic de bradicàrdia de l'esportista, més marcada i consistent, requereix més temps i nivell d'entrenament<sup>186,187</sup>. En esportistes de fons, és a dir, de carreres de llarga distància, es comú observar una bradicàrdia sinusal de 45 a 50 batecs per minut (bpm), mentre que acostuma a variar entre 70-80 bpm en individus sedentaris.

Els mecanismes responsables de la bradicardia apunten principalment a un canvi en la regulació del sistema nerviós autònom, consistent en un augment del to parasimpàtic/vagal en relació al to simpàtic<sup>188,189</sup>. Tanmateix altres mecanismes com canvis en la FC intrínseca del cor, és a dir, en absència de regulació pel to autonòmic<sup>190</sup>; mecanismes nerviosos perifèrics a través d'una variació en la sensibilitat dels baroreceptors<sup>191,192</sup> i, per últim, la variabilitat genètica individual, també contribueixen a explicar aquest fenomen.

### Hipertròfia cardíaca

L'augment del volum de les cavitats cardíques i del gruix de les parets miocàrdiques són característiques de l'adaptació estructural del cor en els esportistes<sup>89</sup>. La hipertròfia fisiològica del cor és aquella on les quatre cavitats del cor així com les seves parets augmenten en volum de forma proporcional (hipertròfia excèntrica), traduint-se en un increment del pes de la massa cardíaca total. Aquest tipus d'hipertròfia és típica en esports de resistència/aeròbics que resulten en una sobrecàrrega de volum, mentre que els esports de força/anaeròbics promouen una sobrecàrrega de pressió que resulta en una hipertròfia concèntrica (augment del gruix i disminució de la cavitat). La hipertròfia afavoreix la normalització de l'estrès al que es troba sotmès el ventricle enfront a una càrrega hemodinàmica d'acord amb la llei de Laplace<sup>193</sup>, com per exemple durant l'exercici físic continuat<sup>94</sup>. A més, gràcies a l'hipertròfia el cor és capaç d'expulsar un volum de sang superior durant la pràctica de l'exercici físic, ja que dins les seves cavitats s'hi pot emmagatzemar un volum més gran de sang alhora que l'augment del gruix de les parets li permet obtenir una força de contracció superior per bombejar la sang de manera més eficient. Aquest tipus d'hipertròfia coneguda com a 'cor d'atleta' s'associa a una estructura i funció normal del cor, sense la presència de fibrosi ni mort cel·lular<sup>194-196</sup>.

Gràcies a l'aparició i perfeccionament de la ecocardiografia s'ha pogut entendre millor l'adaptació del cor de l'esportista. Aquesta tècnica no invasiva permet valorar les dimensions de les cavitats cardíques, el gruix de les seves parets i la seva funcionalitat. En l'actualitat és considerada com a tècnica d'elecció per valorar el grau d'hipertròfia ventricular i realitzar el diagnòstic diferencial amb la miocardiopatia hipertròfica i altres cardiopaties que cursen amb un augment del tamany del cor. El VE és la cavitat més estudiada tant per ser més fàcilment accessible tant per la seva geometria més simple. La major part dels estudis ecocardiogràfics coincideixen que els esportistes de resistència són els que desenvolupen un augment més marcat de les dimensions de la cavitat del VE i del gruix de les parets que, excepcionalment, poden superar els límits de normalitat establerts clàssicament per a la població general<sup>197-200</sup>. Un metanàlisi de *Fagard RH*<sup>201</sup> va analitzar 10 estudis que incloïen 135 corredors de llarga distància i 173 controls, i van observar que els atletes presentaven parets més gruixudes i un diàmetre diastòlic més gran del VE en comparació amb els subjectes control. A més, 69 ciclistes dels 4 estudis presentaven un augment del diàmetre intern del VE i del gruix de la paret lliure del VE en comparació amb els individus control. Entre els estudis transversals, cal destacar els realitzats per *Pelliccia*<sup>198-200</sup> en poblacions de quasi mil esportistes d'ambdós sexes i del voltant de 27 disciplines esportives diferents. En aquests estudis es va observar un augment del gruix de la paret de VE que s'associava de manera independent a l'àrea de la superfície corporal, a l'edat, al sexe masculí, i també a certs tipus de disciplines

esportives com el ciclisme i el rem. Els resultats d'estudis ecocardiogràfics s'han pogut confirmar amb imatge per ressonància magnètica<sup>202,203</sup>.

En poblacions grans d'atletes d'alt rendiment, s'ha observat una lleu dilatació de l'aurícula esquerra (AE) que s'ha identificat com una adaptació fisiològica a l'entrenament de resistència. Per exemple, *Pelliccia et al.*<sup>131</sup> van analitzar una població de 1777 atletes competitiu. La dimensió de l'AE a nivell anteroposterior es va trobar augmentada en 347 atletes (20%), incluint 38 (2%) amb una dilatació marcada ( $\geq 45$  mm). *D'Andrea et al.*<sup>204</sup> van analitzar 615 atletes d'elit (370 de resistència vs 245 de força). El volum màxim de l'AE es va analitzar a nivell de la vàlvula mitral. L'estudi va mostrar un augment lleu del volum de l'AE en 150 atletes i un augment moderat únicament en 20 (3.2%), tots ells homes. A més, el volum màxim de l'AE va ser significativament superior en els atletes de resistència en comparació amb els de força.

Durant l'exercici, ambdós ventricles han d'incrementar el VS en resposta a un augment del CC associat a l'exercici. Aquesta càrrega de treball imposa un alt estrès sobre les estructures miocàrdiques, el qual té molta importància especialment al VD, que en general està adaptat a treballar a baixes pressions en condicions fisiològiques. Clàssicament l'estudi del cor d'atleta s'ha centrat en el VE, tot i que en les dues últimes dècades, gràcies a l'introducció de tècniques avançades d'ecocardiografia i de tècniques d'imatge per ressonància magnètica, el remodelat del VD associat a l'exercici s'ha començat a descriure. L'estudi de *Scharhag et al.*<sup>202</sup> comparava 21 atletes de resistència amb controls aparellats no entrenats. Els autors van confirmar una major dimensió interna del VE i de la massa cardíaca en els atletes. A més, el volum diastòlic del VD es trobava incrementat un 25% i la seva massa un 37%. Les ràtios entre el VE i el VD eren similars entre grups. Els mateixos resultats es van observar en un altre estudi, on la dilatació del VD relacionada amb l'exercici de resistència va ser proporcional a la dilatació del VE<sup>205</sup>. Tanmateix, la dilatació harmònica entre el VE i el VD en esportistes d'elit és un tema controvertit. Estudis com els de *La Gerche et al.*<sup>206</sup> i *Oxborough et al.*<sup>207</sup> suggereixen canvis més marcats i desproporcionats en el VD en atletes.

#### Augment del volum sistòlic

En general, en esportistes l'índex de contractilitat o funció sistòlica està preservada<sup>89,208</sup>. Així doncs sembla ser que l'augment del VS del cor entrenat en repòs (120-130 ml vs 70-80 ml), és degut a un increment del volum telediastòlic i no a un increment de la contractilitat miocàrdica global.

Durant l'exercici a intensitats màximes, els esportistes poden arribar a augmentar el CC fins a dues vegades en comparació amb individus sedentaris<sup>209</sup>. Aquests valors tan



elevats són conseqüència d'un augment del VS (170-180 ml) durant l'exercici. A intensitats moderades, aquest augment és conseqüència d'un major retorn venós i millor ompliment ventricular i presenten, en general, un volum telediastòlic més gran. Tot i així, en individus entrenats a intensitats molts elevades s'aprecia un augment de la fracció d'ejecció per un augment de la contractilitat miocàrdica. Aquest fet podria explicar el progressiu increment del VS fins a intensitats màximes d'exercici<sup>210,211</sup>.

Gràcies a les tècniques d'imatge cardíques, cada vegada hi ha més evidència que la funció diastòlica del VE es troba potenciada en els atletes de resistència en comparació amb individus no entrenats o controls<sup>212,213</sup>, evidenciant una millora de la distensibilitat miocàrdica, un augment del volum d'ompliment ventricular i una reducció del volum provinent de la contracció auricular. Aquesta millora ja observada en repòs, es fa més evident durant l'exercici<sup>214</sup> i permet que la contracció ventricular sigui més eficient amb l'increment de la FC. Segons *Gledhill et al.*<sup>211</sup>, la millora en l'ompliment ventricular podria ser determinant en l'increment del VS fins a intensitats d'exercici màximes i, estaria modulada per canvis a nivell bioquímic i ultraestructural del miocardi.

### Augment de la densitat capil·lar del miocardi

En estudis experimentals en animals amb entrenaments aeròbics s'ha demostrat un augment del flux coronari i de la permeabilitat capil·lar<sup>215,216</sup>, a més d'una millora de la capacitat dilatadora coronària<sup>217</sup>. A més del fenomen d'augment de densitat capil·lar, l'exercici de resistència també augmenta el calibre dels vasos coronaris a l'epicardi<sup>218</sup>, per tal de mantenir la correcta perfusió del miocardi. La perfusió miocàrdica també millora per la bradicàrdia, tant en repòs com durant l'exercici, que allarga la duració de la diàstole (fase de major reflux coronari). A més, *Haskell et al.*<sup>219</sup> van observar una major capacitat de dilatació de les artèries coronàries en maratonians, tot i que el calibre no estava augmentat en comparació amb individus sedentaris.

### **Adaptació perifèrica (vascular)**

Amb la finalitat de recollir un volum de sang més gran durant l'exercici, l'arbre circulatori ha de contribuir a un augment de la reserva vascular i per tant pateix una sèrie d'adaptacions tant estructurals com funcionals en resposta a l'exercici de resistència. Estudis inicials amb autòpsies van suggerir un increment de la mida arterial en atletes<sup>220</sup> i persones entrenades<sup>221</sup>. Més tard, i gràcies a les tècniques ecogràfiques, s'ha demostrat un augment del diàmetre d'artèries i venes de calibre gran i mitjà (artèries pulmonars, aorta o vena cava) en esportistes de llarga distància<sup>222-225</sup>. Estudis en animals també han observat increments del diàmetre arterial associat a l'exercici crònic<sup>226-228</sup>. Existeix també un augment de la vascularització muscular (nº de capil·lars i relació capil·lars/miofibrilles)

que contribueix de manera significativa a l'increment de la superfície circulatòria total<sup>229</sup>. Aquest fenomen és de gran importància, ja que facilita l'intercanvi respiratori i metabòlic a les fibres dels principals músculs actius durant l'exercici<sup>230</sup>.

### Augment del volum plasmàtic

L'exercici físic pot incrementar en un 20-25% el volum plasmàtic a partir dels primers 7-14 dies<sup>231</sup>. Hi ha 2 mecanismes que expliquen l'augment del volum plasmàtic per l'exercici: un major alliberament de l'hormona antidiurètica i de l'aldosterona, i una major quantitat de proteïnes en plasma que incrementa la pressió osmòtica i reté més líquid en sang<sup>200</sup>.

Un volum plasmàtic més gran permet mantenir un flux cutani i una taxa de sudoració més elevades, millorant la capacitat de perdre calor a través de l'evaporació, és a dir, estabilitzant la termoregulació. Per altra banda, l'increment del volum del plasma és un factor important en l'augment del VS per l'exercici. Quan el volum de plasma augmenta, també ho fa el volum sanguini. D'aquesta manera entra més sang al cor i el VS augmenta. A intensitats màximes d'esforç, el  $VO_2$  max es manté relativament estable, i d'aquesta manera un VS més gran permet incrementar el CC màxim. Un augment del CC incrementa la disponibilitat d'oxigen als músculs actius, augmentant el  $VO_2$  max<sup>234</sup>.

### Efectes sobre la pressió arterial

Tot i que els efectes hipotensors de l'entrament de resistència, tant de la Pas com de la Pad, s'han descrit en subjectes normotensos<sup>235</sup>, s'ha observat de manera més marcada en subjectes hipertensos<sup>236</sup>. Entre els mecanismes responsables, una disminució de l'activitat simpàtica hi podria jugar un paper important.

Moltes estudis epidemiològics suggereixen la presència d'una relació dosi-resposta entre la capacitat física i la PA en repòs. Tanmateix, fins al moment no existeix un acord sobre la intensitat d'exercici més adequada per aconseguir una disminució significativa de la PA, ja que fins ara s'ha pogut demostrar que a intensitats moderades d'exercici, les disminucions de la PA són similars o fins i tot superiors a les produïdes per intensitats més elevades d'exercici<sup>250</sup>, suggerint una corba de dosi resposta en forma de "U" invertida<sup>239</sup>. Per últim, si ens fixem en la freqüència de les sessions d'entrenament, l'exercici realitzat a diari sembla ser més efectiu reduint la PA que si es realitza 3 dies per setmana<sup>240</sup>.

### Millora de la capacitat funcional

Totes les adaptacions cardiovasculars descrites anteriorment es tradueixen en una millora significativa de la capacitat funcional de l'individu. Aquesta millora es pot comprovar en el laboratori a través de la durada en la prova d'esforç o bé pel  $VO_2$

$\text{max}^{241,242}$ , que representa el millor índex global per mesurar la capacitat funcional cardiovascular i respiratòria<sup>243</sup>. La millora de la capacitat funcional permet realitzar exercicis de resistència d'un nivell més alt o a un ritme més alt, augmentant el nostre rendiment. A més d'augmentar la capacitat funcional màxima, l'entrenament de resistència també millora la capacitat funcional submàxima (intensitat propera al 50-70% del  $\text{VO}_2 \text{max}$  i que pot mantenir-se durant 30-60 segons) de manera progressiva<sup>244,245</sup>.

### **Factors determinants d'adaptació a l'exercici**

Cal tenir en compte que l'adaptació cardiovascular a l'exercici varia de manera considerable entre atletes i individus sans. Els factors principals que expliquen la gran part d'aquestes diferències són el sexe, la raça, la disciplina esportiva o els factors genètics individuals. En primer lloc, la literatura mostra que en dones atletes el remodelat cardiovascular induït per l'exercici és molt menor que en homes. En un estudi molt important, *Pelliccia et al.*<sup>199</sup> van analitzar mitjançant ecocardiografia un total de 600 atletes italianes i un grup de dones controls sedentàries. Els resultats van mostrar un augment de les dimensions del VE i del gruix de la paret del VE en les atletes en comparació amb les controls. Tanmateix, en comparació amb estudis previs en homes, les dones tenien unes dimensions de la cavitat ventricular significativament menors que els homes (11% menor) i un gruix de paret més petit (23% menor). Els mateixos resultats s'han observat en altres estudis<sup>246-248</sup>.

La raça també és un factor important a l'hora de determinar l'adaptació cardiovascular a l'exercici. Els atletes negres acostumen a tenir una paret del VE més gruixuda en comparació amb els atletes caucàsics. Per exemple, l'estudi de *Basavarajaiah et al.*<sup>249</sup> va estudiar un grup d'atletes caucàsics i negres i va observar, a través d'ecocardiografia, que aproximadament el 20% dels atletes negres presentaven un gruix del VE de com a mínim 12 mm en comparació amb el 4% dels atletes caucàsics. Els mateixos resultats es van observar en un altre estudi en dones caucàsiques i negres<sup>250</sup>.

Com s'ha esmentat prèviament, la disciplina esportiva juga un paper important en la fisiologia de l'exercici. L'estudi de *Morganroth et al.*<sup>251</sup> va mostrar associacions marcades entre el tipus d'esport i la morfologia del VE. Per exemple, en esports on predomina l'exercici isotònic (p.ex: nedadors i corredors), el diàmetre del VE sol ser més gran en comparació amb els participants d'esports amb un alt component isomètric, com l'aixecament de pesos. Els mateixos resultats han estat reproduïts per altres autors<sup>252-254</sup>.

La influència de la genètica en l'adaptació a l'exercici és una àrea d'investigació d'interès creixent. Estudis inicials van examinar polimorfismes diferents per a gens que codifiquen per a proteïnes del SRAA. S'ha observat que el polimorfisme DD per l'ECA està associat a una major hipertròfia del VE després de 10 setmanes d'entrenament, en comparació

amb el polimorfisme II<sup>255</sup>. D'altra banda, els pacients amb hipertensió familiar, és a dir, amb un o els dos pares hipertensos, presenten un major remodelat del VE induït per l'exercici<sup>256</sup>. Recentment, models animals han demostrat la participació de vies de senyalització moleculars en l'adaptació a l'exercici, en les quals la via el factor de creixement de l'insulina 1 (IGF-1)-PI3K-AKT1 semblen tenir un paper central<sup>257,258</sup>.

### 1.4.3. Adaptació patològica a l'exercici de resistència

Tal i com ja s'ha discutit anteriorment, l'activitat física és una manera eficient de disminuir el risc de MCV i allargar l'esperança de vida. La promoció de l'activitat física és doncs fonamental en l'àmbit de la salut pública, contribuint a reduir els factors de risc cardiovascular. Gràcies a les polítiques de salut àmpliament promogudes, en els darrers anys s'ha observat un increment de la pràctica esportiva en la població general. Paral·lelament, han augmentat de forma exponencial els participants en competicions de molt alta intensitat com per exemple maratons, ultramaratons, triatlons, carreres de bicicleta de llarga distància, etc,...<sup>259</sup>. Per exemple, als Estats Units, el número de corredors que han finalitzat una maratón des de l'any 1990 al 2013 ha incrementat un 300%<sup>260</sup>. Tanmateix, les conseqüències de l'exercici de molt alta intensitat han estat escassament estudiades. Estudis recents suggereixen que la pràctica d'exercici físic a altes dosis i de manera sostinguda en el temps podria causar un remodelat advers tant del cor com de les grans artèries<sup>261</sup>. Alguns estudis demostren que sotmetre al cor a altes dosis d'exercici pot conduir a una sobrecàrrega de volum dels ventricles i les aurícules que, de forma continuada, pot induir un remodelat patològic del miocardi amb el desenvolupament de fibrosi, sobretot a les aurícules, creant un substrat potencial per a l'aparició d'arítmies<sup>129,262</sup>. A més, l'exercici d'alta intensitat també podria estar associat a disfunció diastòlica, a un increment de la rigidesa arterial i a una major calcificació de les artèries coronàries<sup>263,264</sup>. Tot i que ser un tema controvertit, la dosi d'exercici podria ser un factor determinant en l'adaptació cardiovascular a l'exercici i, un excès d'exercici podria conduir a la pèrdua dels beneficis obtinguts per l'exercici a dosis moderades o baixes, donant lloc a un remodelat patològic i incrementant el risc cardiovascular (Figura 21). Tot i així, els possibles mecanismes que podrien participar d'aquesta resposta encara no han estat descrits.

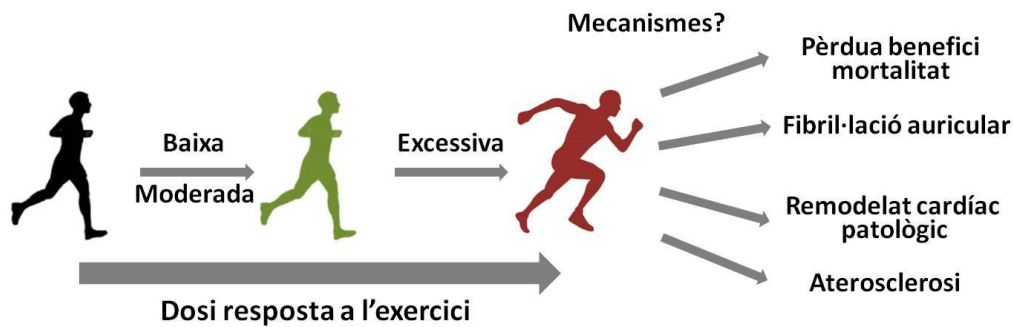


Figura 21. Esquema de la dosi-resposta de l'exercici des de dosis baixes/moderades a dosis altes i possibles repercussions cardiovasculars associades a nivells excessius d'exercici. (Adaptat de referència <sup>265</sup>).

### Relació dosi-resposta entre exercici i mortalitat

Clàssicament la relació entre la dosi d'activitat física realitzada per un individu i la reducció del risc cardiovascular s'ha cregut que seguia una forma lineal, és a dir, aquelles activitats físiques amb una major despesa metabòlica (>METS) estaven associades a una major reducció del risc cardiovascular. Estudis recents però, suggereixen que una relació en forma de "J" o "U" invertida explicaria millor l'efecte de la dosi d'exercici i els beneficis sobre la salut<sup>178,266,267</sup>. En el *Copenhagen Heart Study*<sup>268</sup>, es va realitzar un seguiment de 1.878 corredors i 10.158 no corredors durant 35 anys. En global, es va observar que els corredors tenien un risc de mortalitat un 44% inferior comparat amb els no corredors, i això els representava una mitjana de 6 anys d'esperança de vida afegida. Però un anàlisi més detallat del grup de corredors va mostrar que, en comparació amb els individus sedentaris, la reducció de la mortalitat era major en els corredors d'intensitats moderades. En els individus que corrien a una intensitat més alta, la mortalitat era similar de la dels no corredors. En conclusió, l'estudi suggereix que els beneficis obtinguts per l'exercici moderat es perden amb l'exercici d'alta intensitat<sup>268</sup>.

Aquests resultats són consistents als observats per *Lee et al.*, o en una cohort de 55.137 subjectes (13.016 corredors i 42.212 controls)<sup>185</sup>, córrer a intensitats moderades va reduir la mortalitat de qualsevol causa un 30% (HR, 0.70; 95%CI, 0.64–0.77) i un 45% la mortalitat cardiovascular (HR 0.55; 95%CI 0.46–0.65). Tanmateix, tot i que les reduccions en la mortalitat no van diferir entre les classificacions segons la distància, freqüència, velocitat de carrera o càrrega acumulada d'exercici, si que es va observar una reversió en la reducció de la mortalitat en aquells subjectes amb la càrrega d'exercici acumulada més alta ( $\geq 6$  dies/setmana o  $\geq 176$  min/setmana).

Dos estudis recents també suggereixen una relació en forma de "U" o "J" invertida entre la dosi d'exercici i la mortalitat cardiovascular. En l'estudi de *Armstrong et al.*<sup>269</sup> es van

seguir durant 9 anys un total de 1.1 milió de dones lliures de malaltia vascular. La pràctica d'activitat física moderada es va associar amb un risc menor de malaltia coronària, accidents tromboembòlics i malaltia cerebrovascular en comparació amb la inactivitat física. Tanmateix, entre les dones actives, aquelles que ho fèien a una freqüència més elevada (>5 dies a la setmana) presentaven un risc més alt de malaltia vascular. *Arem et al.*<sup>184</sup> també van observar una reducció màxima de la mortalitat en subjectes que superaven de 3 a 5 vegades l'activitat mínima recomanada per les guies clíniques. En dosis 10 vegades superiors a les recomanades, però no es va observar una reducció afegida d'aquesta mortalitat.

### **Exercici de resistència i arítmies auriculars**

Una pràctica excessiva d'exercici de resistència a altes intensitats s'associa a una prevalença més elevada de FA. El primer article publicat on es va demostrar aquesta associació va ser en corredors d'orientació finesos l'any 1998<sup>128</sup>. Des d'aleshores, diferents estudis clínics i epidemiològics han investigat aquesta associació<sup>129-131128129270271</sup>. En global, s'ha descrit un increment de 5 a 10 vegades del risc de FA en els atletes d'elit, tot i que aquest risc depèn del tipus, de la intensitat i de la freqüència de l'exercici practicat<sup>272</sup>. En l'estudi prospectiu d'Andersen *et al.*<sup>273</sup> es va caracteritzar l'associació entre FA i la pràctica d'esquí de fons. En aquest estudi, es van seguir 52.775 participants de la cursa de Vasaloppet entre els anys 1989-1998 i el 2005. Del total de participants, 919 van patir arítmies i, d'aquests, els que havien participat en més  $\geq 5$  curses (HR1.29, 95%CI 1.04–1.61) i els que les havien finalitzat en menor temps (HR 1.20; 95%CI 0.93–1.55), van presentar un risc incrementat de desenvolupar FA. D'altra banda, un estudi en esportistes no professionals va observar que l'acumulació de pràctica d'exercici de resistència al llarg de la vida de més de 1500 hores, estava associat a aproximadament un risc 3 vegades superior de desenvolupar FA<sup>274</sup>.

Els mecanismes responsables de l'alta incidència de FA en esportistes de resistència encara no han estat completament descrits. Es creu que una activitat parasimpàtica augmentada o to vagal, un increment de les dimensions de l'AE associada amb un remodelat patològic, hipertensió sistèmica no diagnosticada, inflamació, sobrecàrrega de pressió a l'AE, increments de l'activitat simpàtica durant l'exercici, l'alcohol i la cafeïna hi podrien estar implicats. En un estudi recent de Wihelm *et al.* en 60 corredors de marató no professionals, es va observar un allargament de la duració de la ona P així com un increment del volum de l'AE en els corredors amb més acumulació en hores d'entrenament al llarg de la vida, suggerint que el to parasimpàtic i la mida de l'AE contribueixen al desenvolupament de FA en aquests atletes<sup>275</sup>. A més, estudis

experimentals com el de Guasch i Benito<sup>276</sup> i Aschar-Sobbi *et al.*<sup>277</sup> concorden amb els estudis en humans.

### **Exercici de resistència i remodelat patològic ventricular**

La displàsia aritmogènica del VD és una malaltia genètica que es caracteritza pel reemplaçament dels cardiomiòcits del VD per adipòcits. Dades recents suggereixen que l'exercici de resistència incrementa la penetrància d'aquesta malaltia, accelerant el desenvolupament de disfunció sistòlica i arítmies ventriculars<sup>278</sup>. S'ha hipotetitzat que episodis repetitius d'exercici indueixen increments de les pressions pulmonars que podrien incrementar la postcàrrega del VD facilitant el remodelat patològic d'aquesta cavitat. En un article previ del nostre grup, Benito *et al.*<sup>279</sup>, van observar que l'exercici de resistència crònic promovia la hipertròfia del VD així com un increment de la fibrosi d'aquesta cavitat. A més, es va aconseguir induir taquiarítmia ventricular a un 42% de les rates entrenades en comparació amb un 6% de les rates sedentàries. Els resultats d'Ector *et al.*<sup>280</sup>, on es comparaven grup d'atletes de resistència amb arítmies ventriculars (n=22) i sense (n=10) amb controls (n=10), van demostrar que els atletes amb arítmies ventriculars presentaven una disfunció del VD (una fracció d'ejecció menor) en comparació amb els altres grups. Un estudi important de *La Gerche et al.*<sup>206</sup> va estudiar a 40 atletes altament entrenats abans, immediatament després i una setmana després de la participació en diferents carreres d'ultra fons. Els autors van observar una forta correlació entre els increments de biomarcadors (troponina cardíaca, pèptic natriurètic B) i les reduccions de la fracció d'ejecció del VD, que no van correlacionar amb la fracció d'ejecció del VE. La funció del VD es va recuperar una setmana després de la participació a la carrera. Tanmateix, la RMN cardíaca va revelar la presència de fibrosi local tant en el septe interventricular com en el VD, particularment en els atletes que havien acumulat més exposició a l'exercici.

### **Exercici de resistència i aterosclerosi**

La malaltia ateroscleròtica coronària és una causa important de morbiditat i mortalitat cardiovascular en els països desenvolupats<sup>281</sup>. El desenvolupament d'aquesta malaltia és complex i involucra diversos factors com la inflamació, calcificació i l'aparició de plaques ateromatoses dins de la paret de les artèries coronàries<sup>282,283</sup>. La calcificació coronària arterial (CAC) permet mesurar l'aterosclerosi subclínica i permet millorar l'estratificació per risc en pacients amb factors de risc cardiovascular intermedis.

L'activitat física, especialment d'intensitat moderada, està associada a una reducció del CAC. Tot i així, estudis recents han observat una relació entre nivell alts d'exercici físic i una major presència de CAC en esportistes de resistència. Per exemple, Möhlenkamp *et*

*al*<sup>284</sup>. van estudiar 108 corredors de marató (edat  $57.2 \pm 5.7$  anys,  $\geq 5$  maratons corregudes) i van observar índexs de CAC més elevats en els corredors de marató en comparació als controls aparellats segons factors de risc. Després d'un seguiment de 2 anys, 4 corredors amb un CAC  $\geq 100$  van patir accidents coronaris isquèmics. Un altre estudi longitudinal més recent de Schwartz *et al*<sup>285</sup> va comparar 50 corredors de marató amb 23 controls sedentaris. Els corredors de marató havien completat almenys una marató per any en els darrers 25 anys. Els resultats consistents amb els de Möhlenkamp, van demostrar un increment del volum de CAC en els corredors en comparació al grup control. Resultats previs suggereixen que els síndromes coronaris induïts per l'exercici podrien ser resultat d'una ruptura de la placa i trombosi coronària. Contràriament, l'índex CAC s'ha associat prèviament amb l'estabilització de la placa coronària<sup>286</sup>. Per tant, seria possible que un augment del risc de CAC representi una resposta adaptativa a l'estrès hemodinàmic induït per l'exercici, en corredors amb malaltia coronària ateroscleròtica prèviament establerta. L'estudi de Kim *et al.*<sup>287</sup>, va incloure corredors de marató veterans als quals se'ls hi va realitzar una angiografia coronària immediatament després d'haver patit una aturada cardíaca de causa isquèmica durant una carrera de llarga distància. Sorprenentment, els resultats no van mostrar presència de ruptura de placa en aquests individus, suggerint que la isquèmia deguda a un desequilibri entre l'aportació d'oxigen i la seva demanda en les lesions amb estenosi, podria jugar un paper principal en el desenvolupament d'accidents coronaris aguts relacionats amb l'exercici. Tanmateix, això només són hipòtesis, ja que els mecanismes que podrien explicar aquesta associació romanen, en gran part, desconeguts.

## **SÍNDROME DE L'APNEA DEL SON I PATOLOGIA CARDIOVASCULAR**

### **1.4.4. Característiques generals de la SAOS**

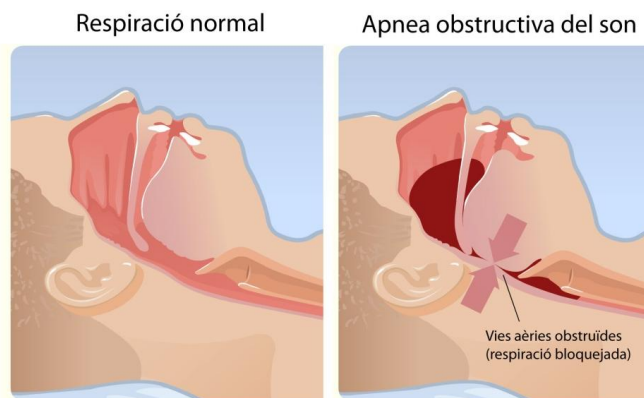
La SAOS és un trastorn de la son relacionat amb la respiració molt prevalent en la població general. S'estima que a Estats Units, 15 milions de pacients adults tenen SAOS i a Espanya, entre el 3 i el 6% de la població pateix una SAOS simptomàtica. L'edat i el sexe són dos factors implicats en la prevalença d'aquesta malaltia<sup>288,289</sup>. Els homes tenen de 2 a 3 vegades un risc més elevat de patir SAOS en comparació a les dones i per les persones majors de 60 anys, el risc és aproximadament 17 vegades més elevat que en persones de mitjana edat.

La SAOS es caracteritza per una obstrucció total (apnea) o parcial (hipoapnea) de la faringe durant el son que s'acompanya d'esforços respiratoris. La hipoapnea es defineix com una reducció del flux aeri d'almenys el 50% del normal, acompanyada d'una reducció de la saturació de la oxihemoglobina. Per altra banda, l'apnea es defineix com una



interrupció completa de flux aeri d'una duració mínima de 10 segons<sup>290</sup> (Figura 22). Els episodis d'apnea es mesuren amb l'índex d'apnees-hipoapnees (IAH), que correspon a la suma del número d'apnees i hipoapnees dividida per hora de son, detectades a través d'un estudi de la son<sup>291</sup>. Les guies internacionals descriuen una apnea com a obstructiva quan un pacient presenta esforços respiratoris persistents i un IAH  $>5$ <sup>292,293</sup>.

Les principals conseqüències fisiològiques produïdes per la SAOS són la hipòxia intermitent (HI), els canvis en la pressió intratoràcica i els microdespertars. La SAOS està associada de manera freqüent a fortes desaturacions d'oxigen que solen tenir una duració d'aproxidament 1 min i que causen HI. A més, durant les apnees el col·lapse de les vies aèries superiors parcial o complet, exigeix una força inspiratòria repetitiva en contra d'aquestes vies obstruïdes, disminuint de manera marcada les pressions intratoràciques fins a valors de -60 mmHg o -80 mmHg<sup>294</sup>. Finalment, la majoria d'apnees/hipoapnees provoquen microdespertars per tal d'incrementar el to muscular dels músculs dilatadors de les vies aèries superiors i restablir així el pas del flux aeri<sup>295</sup>.



**Figura 22. L'apnea obstructiva del son.** Representació de les vies aèries superiors en condicions normals (panell esquerre) i durant l'apnea obstructiva del son (panell dret). (Adaptat de referència<sup>296</sup>).

La gravetat de la SAOS es classifica en tres grups: lleu (IAH: 5-15/h), moderada (IAH: 15-29/h) i greu (IAH $>30$ /h)<sup>297</sup>. El tractament mèdic es decideix en funció d'aquest índex, de les característiques del pacient i sobretot dels símptomes, tot i que les comorbilitats associades també es tenen en compte. Les mesures higienico-dietètiques com dormir de costat un número mínim d'hores i perdre pes, constitueixen el tractament conservador de la SAOS indicat en qualsevol cas i suficient en aquells pacients que presenten un IAH baix. En els casos en que aquest tractament és insuficient, s'opta pel tractament amb CPAP (*Continuous Positive Airway Pressure*)<sup>298</sup>. El CPAP és el tractament més efectiu per la SAOS i consisteix en proporcionar un flux d'aire constant a través d'una mascareta facial, mantenint d'aquesta manera la via aèria oberta<sup>299</sup>. En casos més concrets, alguns pacients requereixen tractaments quirúrgics o bé dispositius d'avançament mandibular.

#### 1.4.5. Efectes cardiovasculars de la SAOS

### **Efectes sobre el son**

Durant la fase REM (*Rapid Eye Movement*) del son, l'activitat simpàtica, la PA i la FC disminueixen però l'activitat vagal cardíaca incrementa<sup>300</sup>. Tot i que es produeixen pics d'elevació de l'activitat simpàtica, de la PA i de la FC, en general la PAM i la FC romanen a nivells més baixos que durant l'estat de vigília. Tanmateix, aquest estat es veu interromput en la SAOS, generant fluctuacions en la respiració. En una primera fase de l'apnea, la PA i la FC disminueixen, però a mida que la saturació de l'oxigen (SaO<sub>2</sub>) baixa, la PA i la FC incrementen progressivament fins al moment del despertar<sup>301</sup>. Aquests despertars, tot i ser un mecanisme protector per tal d'obrir les vies aèries, contribueixen a la fisiopatologia de la SAOS. La repetició dels microdespertars pot conduir a una fragmentació del son, a una reducció de la qualitat del son i a una disminució dels moviments ràpids dels ulls. La fragmentació del son resulta en increments de l'activació del sistema nerviós simpàtic, causant inflamació i reduint la tolerància a la glucosa, efectes que contribueixen al desenvolupament de malaltia vascular.

### **Efectes mecànics**

Durant les apnees obstructives es generen pressions intratoràciques negatives degut a la resistència en contra de l'obstrucció de la faringe. Les pressions negatives augmenten la pressió del VE, incrementant la postcàrrega<sup>302</sup>. A més, també hi ha un augment del retorn venós, augmentant la precàrrega del VD, disminuint el VS i el CC durant les apnees<sup>303,304</sup>.

L'increment de la pressió del VE també incrementa la demanda d'oxigen però simultàniament es produeix una reducció del flux coronari associat a la hipòxia, que redueix l'aportació d'oxigen<sup>302</sup>. Aquest efecte pot donar lloc a isquèmia miocàrdica, alterant la contractilitat cardíaca i la funció diastòlica<sup>305</sup>. A llarg termini, aquestes alteracions poden conduir al desenvolupament de remodelat cardíac patològic, hipertròfia i insuficiència cardíaca.

### **Efectes sobre el sistema nerviós autònom**

L'HI i l'hipercàpnia produïda per la SAOS estimulen els quimiorceptors, tant centrals com perifèrics, i augmenten l'activitat del sistema nerviós simpàtic<sup>306</sup>. A més, les reduccions de la PA i el VS activen de manera reflexa el sistema simpàtic, a través dels baroreceptors presents al sinus carotídi. Els microdespertars i finals de l'apnea també contribueixen a un augment del sistema simpàtic i a una reducció de l'activitat vagal cardíaca<sup>307,308</sup>.

#### 1.4.6. SAOS i malaltia cardiovascular

La SAOS és un problema de salut pública àmpliament reconegut degut a seva alta prevalença i a la severitat dels efectes que comporta, els quals inclouen somnolència, alteracions cognitives i morbiditat i mortalitat cardiovascular associada<sup>309-311</sup>. Una quantitat creixent d'estudis demostren l'associació entre els trastorns relacionats amb el son (TSR) i diverses MCVs<sup>312</sup>, com la fibril·lació auricular (FA)<sup>124</sup>, la malaltia coronària arterial<sup>313</sup>, la insuficiència cardíaca<sup>314</sup>, l'hipertensió<sup>315</sup>, l'infart de miocardi<sup>316</sup> i la mort sobtada<sup>317</sup>. Tot i així, és difícil establir una associació directa degut als factors de confusió presents en els individus amb SAOS, com l'obesitat, la síndrome metabòlica o el tabaquisme, que dificulten l'establiment d'una relació causal entre la SAOS i les MCVs. Els resultats de diferents estudis clínics suggereixen que entre els diversos TSRs, la SAOS és un factor de risc independent de MCVs, com la hipertensió, la malaltia coronària, l'ictus o l'infart de miocardi<sup>312,318,319</sup>. A més, la SAOS s'associa a una major dilatació aòrtica, a un increment de la rigidesa vascular i a un risc més elevat d'arteriosclerosi<sup>320-322</sup>.

#### SAOS com a factor de risc per l'aterosclerosi

Diversos estudis clínics en humans han observat una associació positiva entre els marcadors d'aterosclerosi i la SAOS<sup>323-327</sup>. Tanmateix, una limitació d'aquests estudis és el fet de que en la majoria de pacients, múltiples factors de risc proaterogènics coexisteixen amb la SAOS. Per tal d'evitar els factors de confusió associats a la SAOS, Drager *et al.*<sup>328</sup> van avaluar un grup de pacients joves (<55 anys) amb SAOS lliures de comorbiditats i que no seguien cap tractament farmacològic. En comparació amb controls aparellats sense SAOS, els pacients amb SAOS presentaven un increment de rigidesa arterial i signes d'aterosclerosi primerenca. A més, la severitat de les anormalitats vasculars observades va correlacionar amb la severitat de la SAOS. Una possible limitació d'aquest estudi és que el grup de pacients joves seleccionats no representen el típic pacient amb SAOS. Cal tenir en compte que el 50% dels pacients amb SAOS presenten hipertensió, un factor de risc àmpliament conegut d'aterosclerosi<sup>329</sup>. Recentment, un estudi del mateix grup<sup>325</sup> va estudiar pacients amb síndrome metabòlica, la totalitat dels quals presentava factors de risc per aterosclerosi. La SAOS es va trobar present en el 63% dels pacients i es va associar de manera independent amb els marcadors d'aterosclerosi. Aquests resultats indiquen que el risc d'aterosclerosi associat a la SAOS afecta tant a pacients amb comorbiditats com a pacients sense comorbiditats. Per tal de determinar la relació causal entre la SAOS i l'aterosclerosi, el *Sleep Heart Health Study*<sup>330</sup>, un estudi prospectiu, va seguir durant un període de 5 anys una cohort de 408 pacients d'edat compresa en 70 anys o més joves amb patologia vascular

establerta. L'estudi va demostrar que únicament la SAOS severa s'associava a un increment de futurs esdeveniments cardiovasculars i que aquesta associació era més forta en el cas d'ictus i malaltia arterial coronària. En conclusió doncs, els estudis anteriors suggereixen que la SAOS és un factor de risc independent per l'aterosclerosi.

Tal i com s'observa en la figura 23, la hipòxia associada a la SAOS pot causar, a llarg termini, un increment de ROS i promoure l'estrès oxidatiu. A més, la SAOS també pot causar inflamació sistèmica i una activació del sistema nerviós simpàtic, que finalment acaba promovent disfunció endotelial. Les oscil·lacions de la pressió intratoràcica que poden arribar a assolir valors de -60 mmHg o fins i tot -80 mmHg, generen gradients de pressió a les parets dels vasos, incloent l'aorta, provocant un increment desmesurat del *shear stress*<sup>322</sup>, afavorint la seva dilatació i alterant les seves propietats mecàniques<sup>331</sup>. D'altra banda, els microdespertars durant la SAOS causats pels esforços respiratoris també es consideren una causa directa de disfunció endotelial, degut a l'activació repetitiva del sistema simpàtic associada a increments de la pressió sanguínia aguts que passen a ser mantinguts<sup>322,332-334</sup>. Tot i així, els efectes crònics de la SAOS repetitiva sobre les propietats estructurals i funcionals de l'aorta encara no han estat estudiats en models experimentals clínicament rellevants.

### **SAOS com a factor de risc per a FA**

Existeix una forta associació entre la SAOS i la FA observada de manera consistent en estudis tant epidemiològics com clínics. Múltiples estudis han demostrat un increment del risc de patir FA en pacients amb SAOS així com un risc més elevat de recurrència de FA després d'una cardioversió o d'una ablació mitjançant catèter<sup>335,336</sup>. Els mecanismes fisiopatològics promoguts per la SAOS que s'han descrit com a potencials iniciadors del desenvolupament de FA i del seu manteniment són la HI, la pressió intratoràcica negativa i l'activació del sistema nerviós simpàtic (Figura 23). El desenvolupament de fibrosi auricular és el component principal del remodelat estructural en la FA, creant un substrat per a la seva predisposició<sup>133</sup>. A més, la fibrosi auricular és un predictor tant de la progressió de FA com de la resposta al tractament<sup>337</sup>.

Els estudis experimentals previs amb models animals de SAOS agut que han investigat la seva associació amb la FA, han observat una participació clara del sistema nerviós autònom amb una activació del component vagal<sup>338-340</sup>. Un estudi realitzat amb un model de rata d'obstruccions aèries recurrents, va observar una ràpida activació de les CEs, suggerint que la SAOS indueix una inflamació miocàrdica primerenca<sup>341</sup>. Tot i així, els efectes crònics de la SAOS repetitiva sobre les propietats estructurals de l'aurícula i la susceptibilitat de patir FA encara no han estat estudiats en models experimentals. A més, la majoria de models animals de SAOS utilitzen mètodes invasius i no són capaços de

reproduir els patrons recurrents d'apnees obstructives acompanyades d'esforços respiratoris, similars als experimentats pels propis pacients amb SAOS.

### 1.4.7. Teràpia amb cèl·lules mare i SAOS

Les CMMs són cèl·lules mare multipotents, és a dir, tenen la capacitat de diferenciar-se a diversos tipus cel·lulars dins del llinatge mesodèrmic<sup>342</sup> (adipòcits, osteoblasts, condrocits) així com també a cèl·lules miogèniques<sup>343</sup>. A més, les CMMs tenen la capacitat de modular el sistema immunitari a través dels efectes inhibitoris sobre la proliferació dels limfòcits B i T i de les cèl·lules NK<sup>344</sup>. Quan es produeix una lesió en un dels teixits del nostre cos, s'activa el procés de mobilització de cèl·lules mare des de la medul·la òssia que es dirigeixen al teixit danyat, on es diferencien i actuen a través de diferents mecanismes per tal de reparar-lo.

Les CMMs derivades de la medul·la òssia i del teixit adipós són les dues fonts de progenitors mesenquimals més àmpliament investigades ja que són fàcils d'obtenir i cultivar i presenten una baixa activació del sistema immunitari de l'hoste<sup>345,346</sup>. En la regeneració cardíaca, les CMMs derivades de medul·la òssia han demostrat jugar un paper important, sobretot en el tractament de l'isquèmia secundària a l'IAM. L'administració de CMMs en casos de dany per isquèmia-reperfusió s'ha associat a una reducció significativa de marcadors de mort cel·lular i una millora de la viabilitat, a través de diferents efectes protectors: antifibròtics, immunomoduladors, antiapoptòtics, proangiogènics així com efectes paracrins<sup>347-349</sup>. En un model porcí d'IAM<sup>350,351</sup>, la injecció intravenosa de CMMs, va causar una reducció de l'apoptosi miocàrdica, de l'estrès oxidatiu i de la mida de l'infart a través de la reducció de la senyalització per TGF- $\beta$  i de l'apoptosi, a través de la caspasa 3. En humans, l'estudi de Heldman *et al.*<sup>352</sup> va mostrar que les CMMs presentaven efectes regeneratius i antifibròtics dins del miocardi i que aquests efectes estaven associats a una millora de la capacitat funcional i de la qualitat de vida dels pacients amb cardiomiopatia isquèmica.

Tot i que encara no han estat descrits els mecanismes a través dels quals poden contribuir a la reparació de lesions en diferents òrgans, el seu ventall de potencials aplicacions i la seva fàcil manipulació en cultius cel·lulars, fan que les CMMs siguin bones candidates per a la prevenció del remodelat cardiovascular associat a la SAOS<sup>353</sup>. De fet, estudis recents tant experimentals com amb pacients han aportat evidència científica que reforça la hipòtesi de que les cèl·lules mare adultes podrien jugar un paper d'homeòstasi important en els processos d'inflamació i disfunció endotelial associats a la SAOS<sup>354,355</sup>. Per altra banda, la teràpia amb cèl·lules mares es considera una estratègia emergent per a la prevenció i reversió del remodelat miocàrdic promovent la regeneració del teixit

cardíac. Estudis clínics ja han demostrat eficàcia en l'ús de CMMs i cèl·lules derivades del teixit cardíac en la reducció de l'infart de miocardi i en la millora regional de la contractilitat<sup>346</sup>. Altres estudis també han observat una reducció de la fibrosi cardíaca en diferents condicions experimentals<sup>356,357</sup>.

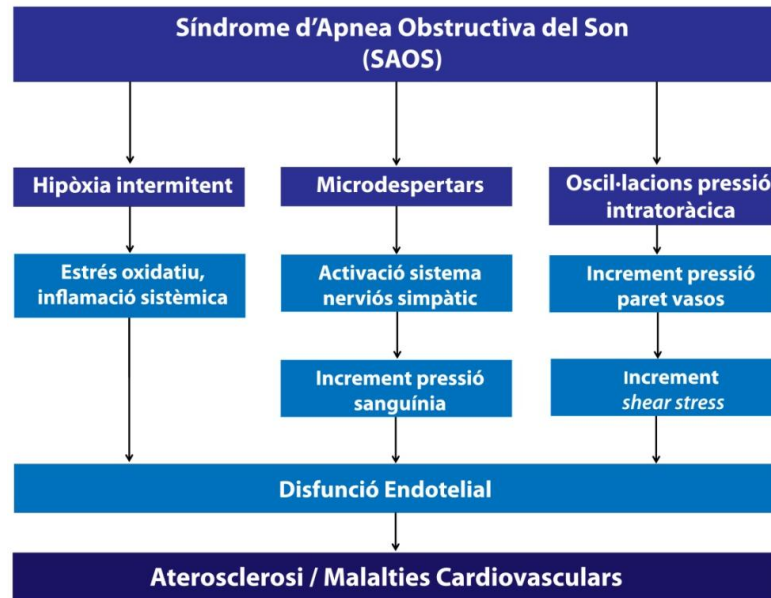


Figura 23. Mecanismes de dany vascular en la SAOS. (Adaptat de referència <sup>322</sup>).



## **2. OBJECTIU GENERAL**





## 2.1. OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general d'aquesta tesi és analitzar el remodelat cardíac i vascular produït per dos factors de risc cardiovascular emergents en les societats occidentals, com són l'exercici de resistència d'alta intensitat, i la SAOS, en dos models animals crònics.

Els objectius principals de la tesi es resumeixen en els següents punts:

**Objectiu 1:** Estudiar el remodelat vascular associat a l'exercici físic intens.

**Objectiu 2:** Estudiar el remodelat vascular associat a la SAOS i analitzar la seva possible prevenció mitjançant l'administració de cèl·lules mare mesenquimals.

**Objectiu 3:** Estudiar el remodelat auricular associat a l'exercici físic intens i analitzar la seva possible prevenció mitjançant l'administració de sildenafil.

**Objectiu 4:** Estudiar el remodelat auricular associat a la SAOS i analitzar la seva possible prevenció mitjançant l'administració de cèl·lules mare mesenquimals.

Els objectius 1 i 2 s'han estudiat en un primer estudi, mentre que els objectius 3 i 4 s'han estudiat en un segon estudi. Cada projecte ha estat dividit en dos sub-estudis per tal de complir els objectius de la tesi.



## **ESTUDI 1:**

### ESTUDI DEL REMODELAT VASCULAR



### **3. SUB-ESTUDI 1.1:**

Estudi del remodelat vascular  
associat a l'exercici físic intens



### 3.1. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

#### Hipòtesi de treball

L'efecte de la pràctica continuada d'exercici físic d'alta intensitat pot incrementar el risc vascular abolint els efectes protectors de l'exercici físic d'intensitat moderada.

#### Objectius

Aquest estudi té l'objectiu de comparar els efectes vasculars provocats per la pràctica continuada d'exercici intens, d'exercici moderat i de l'estil de vida sedentari. Concretament aquest estudi es centra en l'anàlisi del remodelat vascular de l'aorta toràctica descendent, i en segon lloc de l'artèria caròtida i vasos intramiocàrdics.

Els objectius específics d'aquest sub-estudi són:

- Estudi del remodelat estructural de l'aorta causat per l'exercici intens i moderat.
- Estudi del remodelat funcional de l'aorta causat per l'exercici intens i moderat.
- Estudi del remodelat estructural de l'artèria caròtida i de vasos intramiocàrdics causat per l'exercici intens i moderat.
- Estudi dels mecanismes implicats en el remodelat vascular causat per l'exercici intens.



## 3.2. METODOLOGIA

### 3.2.1. Protocol d'entrenament

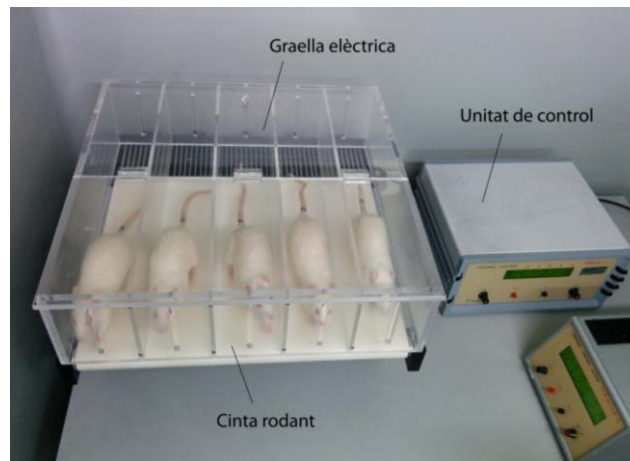
Aquest estudi es va realitzar d'acord amb les normes reguladores de la Unió Europea per l'ús d'animals d'experimentació (Directiva 86/609/EEC i 2010/63/UE) i va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

Es van utilitzar rates mascles de la soca Wistar (*Charles River Laboratories*, França) amb un pes de 200-250g a l'inici de l'experiment. Tots els animals van ser estabulats en condicions controlades de temperatura (22-24°C) i d'humitat relativa (60-65%) amb cicles alternats de llum/fosc de 12 hores, i van tenir accés *ad libitum* a menjar i aigua.

Les rates van ser assignades de forma aleatòria en tres grups: grup sedentari (SED), grup exercici d'intensitat moderada (MOD, 45min a 35cm/s) i grup exercici d'alta intensitat (INT, 60min a 60cm/s). Dues setmanes prèvies a l'inici del protocol, les rates es van sotmetre a un període d'adaptació a la cinta i a l'entrenament, amb un increment progressiu de la intensitat i de la duració de l'exercici fins a assolir la velocitat màxima establerta en cada grup. Els animals es van sotmetre a un protocol d'entrenament de carrera continuada en cinta rodant (*Treadmill for animals* LE8710R, Panlab, Barcelona, Espanya), 5 dies a la setmana durant un total de 16 setmanes.

Durant l'estudi es va disposar de dos aparells *Treadmill* amb cintes rodants amb una capacitat per a 5 rates, que van permetre fer córrer un total de 10 rates de forma simultània. La cinta es troba dividida en cinc carrils, amb velocitat i pendent regulables a través d'una unitat de control (Figura 24). Per tal d'assegurar que els animals corrin, a la part posterior dels carrils hi ha una graella que administra petites descàrregues elèctriques (0.3-2 mA) al contacte amb l'animal. Només es van incloure a l'estudi les rates que es van adaptar correctament a la carrera continuada patint un número mínim de descàrregues elèctriques. Durant tot el protocol es va fer un seguiment diari dels animals, observant la presència de senyals de patiment o estrès, seguint el protocol de supervisió de Morton i Griffiths<sup>358</sup>.

El model animal d'exercici d'alta intensitat va ser desenvolupat pel nostre grup (Arítmies, Resincronització i Imatge Cardíaca, IDIBAPS) l'any 2004 en col·laboració amb el grup de Patologia Experimental de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC), amb l'objectiu d'analitzar el substrat arritmogènic del cor associat a l'exercici. El model animal va ser dissenyat amb l'objectiu de reproduir una pauta d'entrenament extrapolable en humans a aproximadament 10 anys d'exercici intens equivalent a una despesa màxima d'oxigen del 85-90%<sup>359</sup>.



**Figura 24. Cinta rodant amb cinc carrils utilitzada pel protocol d'entrenament.** A la dreta de la imatge es pot observar la unitat de control que permet regular la intensitat de la velocitat de la cinta rodant i la intensitat de les descàrregues elèctriques (graella elèctrica).

### 3.2.2. Grups experimentals

Per aquest estudi es van realitzar dos estudis consecutius i separats en el temps. A continuació es pot observar el número d'animals de cada grup utilitzat en cada estudi i la suma total d'animals.

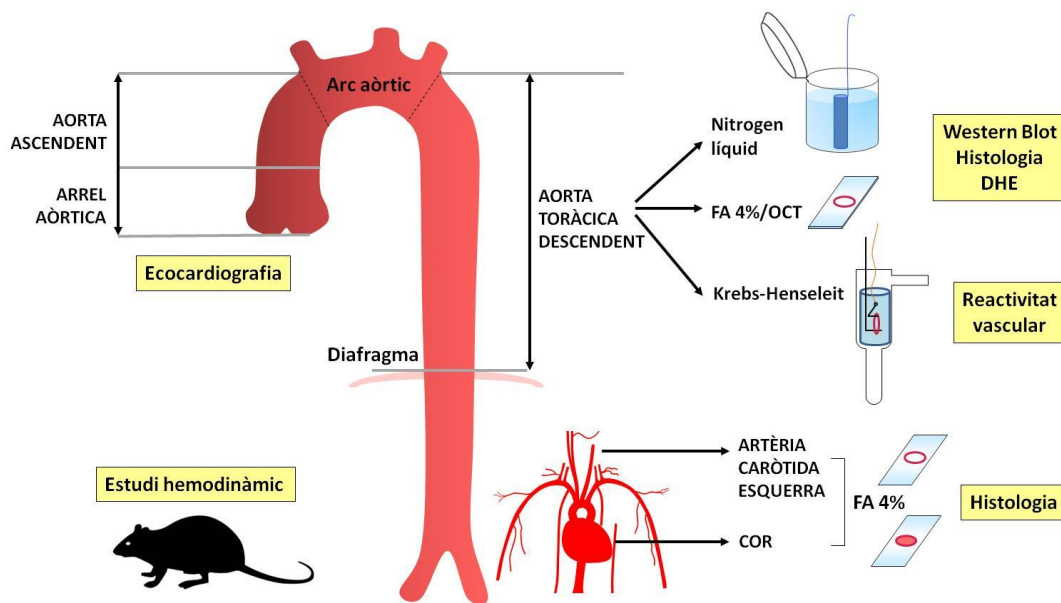
- Grup sedentari (SED):  $21+11= 32$ .
- Grup exercici d'intensitat moderada (MOD):  $20+10= 30$ .
- Grup exercici d'alta intensitat (INT):  $16+10= 26$ .

### 3.2.3. Eutanàsia i recollida de mostres

La duració de cadascun dels estudis va ser de 150-180 dies en els que s'inclouen els 10 dies d'adaptació, les 16 setmanes d'entrenament i l'eutanàsia escalonada dels animals. L'eutanàsia es va realitzar 3 dies després de la última sessió d'entrenament de cada animal per evitar els possibles efectes aguts de l'exercici, mitjançant una sobredosi d'isoflurà (5%) i exsanguinació.

L'estudi ecocardiogràfic al finalitzar les 16 setmanes, un mínim de 6 hores després de la última sessió d'entrenament va ser realitzat per la Dra. Maria Sanz. L'estudi hemodinàmic *in vivo* als animals intubats i anestesiats amb isoflurà al 2%, es va realitzar pel Dr. Eduard Guasch el mateix dia de l'eutanàsia. Per a l'estudi histològic de les artèries, es van recollir mostres d'aorta toràcica i d'artèria caròtida esquerra que van ser fixades en formaldehid al 4% durant 24 hores i posteriorment van ser incloses en parafina, o bé es van recollir mostres que es van submergir en medi Tissue-Tek OCT (Optimal Cutting Temperature,

Sakura Finetek Europe) i posteriorment es van congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . També es van recollir mostres d'aorta toràctica que es van congelar ràpidament en nitrogen líquid per estudis de biologia molecular. Finalment es va recollir l'aorta toràctica per a l'estudi de reactivitat vascular. Per a l'anàlisi dels vasos intramiocàrdics, es va extreure el cor ràpidament, es va netejar amb una solució salina per buidar el contingut de sang del seu interior, i es va fixar amb formaldehid al 4% durant 24 hores. Posteriorment el cor fixat es va tallar en 3 seccions sobre l'eix transversal per a la posterior inclusió en parafina. En la figura 25, es mostra un esquema de la recollida de mostres i la tècniques usades.



**Figura 25. Esquema de les tècniques usades i les mostres recollides per a l'estudi de remodelat vascular associat a l'exercici.** FA 4%: Formaldehid 4%; OCT: medi Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature; DHE: Dihidroetidi.

Tots els blocs de parafina es van tallar en seccions de  $4\ \mu\text{m}$  amb un micròtom Leica RM2125RT (Leica microsystems, Wetzlar, Alemanya). A partir dels blocs d'OCT es van obtenir seccions de  $10\ \mu\text{m}$  amb un criostat Leica CM1950 (Leica microsystems). L'obtenció d'imatges es va realitzar amb un microscopi òptic Olympus BX41TF i càmera Olympus DP73 (Olympus Corporation, Japó) i amb el software d'anàlisi d'imatges ZEN CellSens (Carl Zeiss AG, Alemanya).

### 3.2.4. Avaluació de l'hipertrofia cardíaca

Per tal de comprovar l'eficàcia de la pauta d'entrenament físic, es va avaluar el grau d'hipertrofia cardíaca. Al llarg del procediment experimental, es van pesar els animals cada setmana i el dia de l'eutanàsia també es va pesar el cor. D'aquesta manera, es va

normalitzar el pes del cor (g) pel pes de cada animal (kg) a les 16 setmanes, obtenint la ràtio d'hipertrofia cardíaca:

$$\text{Ràtio Hipertrofia} = [\text{Pes Cor (g)} / \text{Pes rata (kg)}]$$

### 3.2.5. Determinació de la pressió sanguínia i freqüència cardíaca

Per tal d'estudiar el remodelat funcional de l'aorta, es va realitzar un estudi hemodinàmic a les rates anestesiades (2% d'isoflurà), intubades i ventilades (CWE inc, Ardmore, PA, EEUU) amb els paràmetres recomanats pel fabricant i mantigudes a  $37.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$  durant l'experiment amb un sistema homeotèrmic (Kent Scientific, EEUU). Es va utilitzar un catèter amb un sensor de pressió a la punta (Transonic, EEUU) que es va introduir a través d'una petita incisió a la caròtida dreta. El catèter es va fer avançar lentament fins arribar a l'aorta toràcica descendent. En aquest punt es va registrar la corba de pressió arterial i es van mesurar la Pas i la Pad a partir de 50 batecs cardíacs consecutius (PowerLab i Labchart v8.0, AD Instruments) i es va obtenir la mitjana de les mesures enregistrades per a cada animal. A partir de la Pas i la Pad es va calcular la PP de cada animal. A més, aquest procediment també va permetre obtenir un registre de la FC en repòs de cada animal.

### 3.2.6. Estudi ecocardiogràfic

A les 16 setmanes es van realitzar ecocardiografies bidimensionals (2D) transtoràciques als animals, després d'un mínim de 6 hores després de la última sessió d'entrenament. El procediment es va realitzar sota anestèsia (2% d'isofluorà) i es va utilitzar el sistema Vivid 7 dimension system (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Noruega) amb una sonda cardíaca sectorial S10 (4.5-11.5 Megahertz). Les mesures es van fer sobre l'eix llarg paraesternal a nivell de l'arrel aòrtica i aorta ascendent (Ao Asc). Es va obtenir el diàmetre mínim al final de la diàstole (Ao min) i el diàmetre màxim durant el pic de la sístole (Ao max) a nivell de l'aorta ascendent (mode M), i es va calcular la pulsatilitat (o distensibilitat) a partir la fórmula:

$$\text{Ao Puls} = (\text{Ao max} - \text{Ao min} / \text{Ao max}) \times 100$$

D'altra banda, es obtenir les dimensions de l'aorta ascendent i l'arrel aòrtica a partir dels ecocardiogràmes en mode M realitzats sobre l'eix llarg paraesternal. Les mesures del diàmetre màxim es van realitzar durant la sístole.

### 3.2.7. Avaluació de la rigidesa aòrtica

La rigidesa aòrtica es va calcular mitjançant mètodes prèviament validats<sup>360361</sup>. A partir de les mesures de PA obtingudes en l'estudi hemodinàmic i de l'anàlisi ecocardiogràfic a nivell de l'aorta ascendent, es va calcular l'índex de rigidesa  $\beta$  per a cada animal, seguint la següent fórmula:

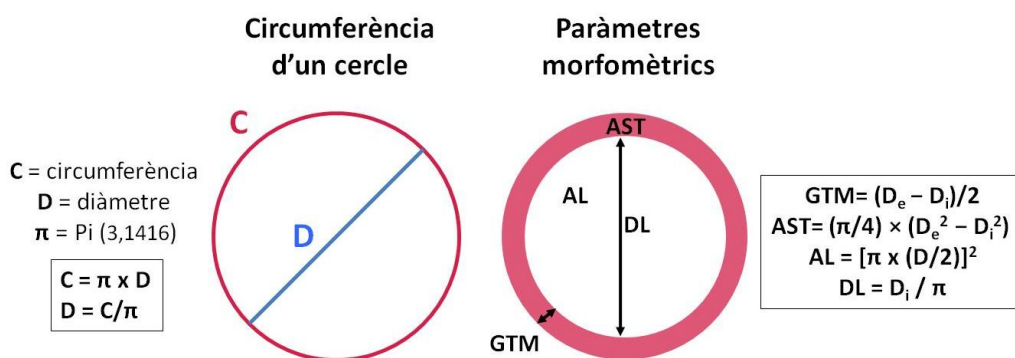
$$\text{Index } \beta = \frac{\ln\left(\frac{Pas}{Pad}\right)}{\frac{Ao_{max} - Ao_{min}}{Ao_{min}}}$$

A més, les propietats elàstiques de la paret arterial de l'aorta també es van estimar amb l'índex *elastic modulus* (Ep), el qual es mesura en quilopascals (kPa).

$$Ep = Pas - Pad / [(Ao_{max} - Ao_{min}) / Ao_{min}]$$

### 3.2.8. Estudi morfomètric de l'aorta

Es va realitzar una tinció d'hematoxilina-eosina de les seccions histològiques de parafina de 4  $\mu\text{m}$ . A partir de les imatges de l'aorta (40X), es van realitzar mesures del perímetre extern i intern del vas (C). La túnica adventícia del vas no es va incloure en l'anàlisi. Es van obtenir les mesures del gruix de la túnica mitja (GTM), de l'àrea de la secció transversal (AST), del diàmetre de la llum (DL), i de la ràtio del gruix respecte el diàmetre de la llum (GTM/DL) (Figura 26). Els càlculs es van obtenir assumint que els vasos adopten una forma circular *in vivo*. El diàmetre extern ( $D_e$ ) i de la llum ( $D_i$ ) es van determinar a partir de la fórmula  $D = C/\pi$ , on C correspon al perímetre extern o intern i  $\pi = 3,1416$ . El GTM es va calcular com a  $(D_e - D_i)/2$ , l'AST com a  $(\pi/4) \times (D_e^2 - D_i^2)$ , i l'àrea de la llum (AL) com a  $[\pi \times (D/2)]^2$ . El DL correspon al  $D_i$ , obtingut a partir de la fórmula  $D_i = C_i/\pi$ . Totes les mesures es van realitzar de forma cega pel mateix investigador.



**Figura 26. Anàlisi morfomètric de l'aorta toràctica.** A l'esquerra de la imatge s'observa la circumferència d'un cercle amb les fórmules usades per al càlcul dels paràmetres morfomètrics. A la dreta s'observa un esquema de les mesures obtingudes a partir de les imatges. AST: àrea de la secció transversal, DL: diàmetre de la llum, GTM: gruix de la túnica mitja.

### 3.2.9. Estudi de les làmines elàstiques de l'aorta

Es van utilitzar seccions de 10 µm d'aorta toràcica descendent congelada en medi Tissue-Tek OCT. Per tal d'avaluar l'organització i la integritat de les làmines elàstiques presents a la túnica media, es van obtenir fotografies (10X) de cinc zones representatives de cada aorta a una longitud d'excitació de 490 nm, ja que a aquesta longitud d'ona es pot observar molt clarament l'autofluorescència de l'elastina. Les preparacions histològiques es van muntar amb el medi ProLong Gold antifade amb DAPI (P36935, Invitrogen, Life Technologies, CA, EEUU) per a la visualització dels nuclis presents a la túnica media, corresponents a les VSMCs. Es van quantificar el número de làmines elàstiques i de nuclis (DAPI) de la túnica media relatiu a l'àrea analitzada ( $\mu\text{m}^2$ ) i després es va calcular la mitjana de totes les fotografies de cada aorta. També es van quantificar el número de ruptures de les làmines elàstiques, definides com a fragmentacions completes d'una làmina elàstica, i es va calcular la mitjana en relació a l'àrea ( $\mu\text{m}^2$ ) en cadascuna de les fotografies. Després es va calcular la mitjana ponderada per l'àrea de totes les fotografies de cada aorta. Per últim, es va analitzar el grau d'elongació de les làmines elàstiques mitjançant una ràtio que es va definir com la llargada no lineal d'una làmina (distància entre els dos extrems reseguint la forma de cada làmina) dividida per la llargada líneal de la làmina (distància entre els dos extrems traçant una línia recta). Així doncs, una ràtio similar a 1 indica que les làmines segueixen una organització més lineal, mentre que si la ràtio  $>1$ , les làmines es troben més elongades, adoptant una forma menys lineal. Es van obtenir mesures de tres làmines elàstiques de cadascuna de les cinc fotografies d'una aorta i es va calcular la mitjana dels valors de les ràtios per a cada aorta.

### 3.2.10. Quantificació de la fibrosi a l'aorta

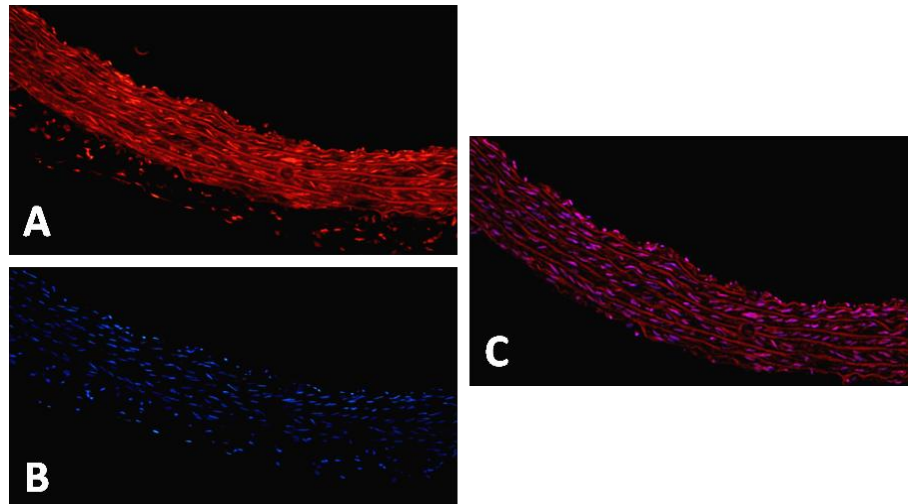
Per tal de quantificar la fibrosi present dins de la túnica media de l'aorta, es va realitzar una tinció de vermell de picosirius en talls de parafina (4µm) d'aorta toràcica. Aquesta tinció histològica tenyeix específicament les fibres de col·lagen, les quals es visualitzen de color vermell amb un microscopi òptic<sup>362</sup>. El protocol de la tinció va consistir en primer lloc en desparafinar i hidratar les mostres incloses en parafina amb una bateria d'alcohols de concentracions decreixents. Seguidament, les mostres es van tractar amb àcid fosfomolibdic durant 2 minuts i es van deixar coberts amb vermell de picosirius durant 60 minuts. A continuació, es van incubar amb àcid clorhídric durant 2 minuts i es van deshidratar amb alcohols de concentració creixent i finalment amb xilol. Es van obtenir diferents fotografies (entre 4 i 5) per a cada aorta (10X) utilitzant els mateixos ajustaments d'imatge per a totes les mostres. Les fotografies es van analitzar mitjançant un mètode semiautomàtic que permet quantificar l'àrea tenyida de color vermell d'una regió d'interès

prèviament definida en relació a l'àrea tissular (percentatge de col·lagen). L'anàlisi morfològic es va realitzar de manera cega pel mateix investigador. La túnica adventícia, així com la túnica íntima van ser excloses de l'anàlisi.

### 3.2.11. Quantificació de la producció de superòxid a l'aorta

La producció de l'anió superòxid ( $O_2^-$ ), un ROS amb un paper molt important en la generació d'estrès oxidatiu, es va determinar *in situ* en seccions transversals d'aorta toràcica descendent prèviament congelades en OCT ( $-80^\circ\text{C}$ ), mitjançant el mètode del dihidroetidi (DHE). El DHE és un colorant fluorescent permeable que quan penetra dins de la cèl·lula interacciona amb l'anió superòxid i s'oxida, generant el subproducte bromur d'etidi, que s'intercala a la cadena d'ADN emitint fluorescència vermella que pot ser detectada mitjançant microscòpia de fluorescència (longitud d'ona d'excitació-emissió: 488-610nm).

El mètode del DHE va consistir en deixar equilibrar els talls ( $10\ \mu\text{m}$ ) d'OCT d'aorta durant 30 min a  $37^\circ\text{C}$  en una solució fisiològica de HEPES (mM: NaCl 137; KCl 2.7;  $\text{MgCl}_2$  0.5;  $\text{CaCl}_2$  1.8; Glucosa 5; Na-HEPES 10;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.36, pH 7.4) i posteriorment incubar-los durant 30 min a  $37^\circ\text{C}$  amb el reactiu DHE a una concentració de  $5\ \mu\text{M}$ , (D7008, Sigma-Aldrich, MO, EEUU) diluït en la mateixa solució fisiològica HEPES, dins d'una càmera humida fosca. Després de la incubació, el DHE es va rentar i els portaobjectes es van muntar amb el medi ProLong Gold antifade amb DAPI (P36935, Invitrogen, Life Technologies). Inmediatament després, es van obtenir imatges de fluorescència (20X) utilitzant els mateixos ajustaments d'imatge de cinc zones representatives de cada aorta a diferents longituds d'excitació: 350 nm (pel DAPI), 490 nm (per l'autofluorescència de l'elastina) i 590 nm (pel bromur d'etidi) per a totes les mostres. Les imatges es van quantificar mitjançant el mètode de colocalització. Aquest mètode consisteix en mesurar la intensitat de píxels presents en una regió d'interès d'una imatge de fluorescència i després mesurar la correlació de la mateixa regió d'interès d'una altra imatge feta a una longitud d'ona diferent (Figura 27). El resultat s'expressa mitjançant el coeficient de correlació de Manders ( $R$ )<sup>363</sup>, proporcional a la quantitat de píxels que col·localitzen en els dos canals analitzats (valors: 0-1). En aquest estudi es va analitzar la colocalització de fluorescència vermella (DHE) amb la fluorescència blava (DAPI) dins de la túnica mitjana de l'aorta. La imatge d'autofluorescència de l'elastina va servir per identificar la regió d'interès i excloure la túnica adventícia.



**Figura 27. Tècnica de dihidroetidi (DHE).** Les fotos A-C mostren imatges de fluorescència obtingudes amb un objectiu de 20X. **A)** Marcatge nuclear de DHE de color vermell (590nm). S'observa marcatge inespecífic degut a l'autofluorescència de les làmines elàstiques de l'aorta. **B)** Marcatge nuclear DAPI de color blau (461nm). **C)** Imatge superposada de les fluorescències del DHE i DAPI.

### 3.2.12. Quantificació dels nivells de proteïna per Western Blot a l'aorta

Es van homogeneïtzar trossos de teixit d'aorta prèviament congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  (3x3 mm) amb un polítró Omni TH (Omni International, GA, EEUU), immersos en una solució de lisi a  $4^{\circ}\text{C}$  que contenia: tampó RIPA (R0278, Sigma-Aldrich) i el còctel complete Mini Protease Inhibitor (11836153001, Roche Suïssa). Després d'una hora en rotació a  $4^{\circ}\text{C}$ , les mostres es van centrifugar a  $10.000\text{g}$  i es va recollir la fase superior o sobrenedant. La concentració total de proteïna es va quantificar amb el mètode de Pierce BCA protein Assay method (23227, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies). Aquest mètode consisteix en un assaig colorimètric basat en la reacció de Biuret, on els enllaços peptídics reaccionen amb els ions de coure II en solució alcalina, amb la presència de l'estabilitzant tartrat, per formar un complex blau-violeta. El kit combina aquesta reacció amb l'àcid bicinconínic (BCA), el qual reacciona amb el complex anterior generant un nou producte de color violeta intens que té una alta sensibilitat. El color violeta obtingut és proporcional a la concentració de proteïna i es pot mesurar a una longitud d'ona de  $562\text{ nm}$  mitjançant espectrofotometria. Les concentracions de proteïna es van obtenir amb el lector de plaques Multi Modal Synergy 2 (Biotek, Instruments Inc., VT, EEUU), relatives a una corba estàndard d'Albúmina Sèrica Bovina (BSA) de diferents concentracions.

Els extractes de proteïna ( $20\ \mu\text{g}$ ) es van separar segons el seu pes molecular en gels NuPage® 4-12% Bis-Tris Gels (NP0322, Invitrogen, Life Technologies) en condicions desnaturalitzants mitjançant electroforesi aplicant un camp elèctric. Prèviament a l'electroforesi, les mostres amb el contingut de proteïna es van barrejar amb un tampó de càrrega (NuPage® LDS Sample Buffer, NP0007, Invitrogen, Life Technologies), que



conté *Lithium Dodecyl Sulphate* (LDS), un detergent que permet mantenir els pèptids presents a les mostres en un estat desnaturalitzat i els dóna una forta càrrega negativa, un cop escalfades a 70°C durant 10 minuts. A més, la matriu del gel de poliacrilamida usada està dissenyada per la separació òptima de proteïnes de mida petita o mitjana amb un gradient de 4-12%. El percentatge de poliacrilamida determina el diàmetre del porus, i es selecciona en funció del pes molecular de la proteïna d'interès. En paral·lel a les mostres analitzades es va fer córrer el marcador de pes molecular Novex® Sharp Standard (LC5800, Invitrogen, Life Technologies), format per diferents proteïnes de pes molecular conegut que ens serveix per indicar-nos el grau de separació de les proteïnes i per estimar el pes de les proteïnes d'interès.

Després de l'electroforesi, les proteïnes del gel es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa mitjançant el sistema iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen, Life Technologies). Aquesta tècnica de transferència consisteix en dirigir les proteïnes o àcids nucleics del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa en 7 minuts, sense la necessitat d'afegir tamps. Per tal d'aconseguir-ho és necessari posar la cara del gel en contacte amb la membrana de nitrocel·lulosa i crear un camp magnètic que empenyi a les proteïnes a sortir del gel. D'aquesta manera la membrana reté les proteïnes que posteriorment seran susceptibles a unir-se a anticossos específics. En aquest punt del procés i amb la finalitat de comprovar la correcta transferència de les proteïnes a la membrana, es van realitzar tincions amb Ponceau S (0.2% Ponceau i 5% d'àcid acètic en aigua destil·lada). Seguidament es van bloquejar les membranes durant 1 hora en un tampó fosfat salí (PBS, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies) amb 5% de llet desnatada en pols i 0.1% de detergent Tween-20 (P1379, Sigma-Aldrich), i es van deixar incubar tota la nit a 4°C i agitació suau amb l'anticòs primari policlonal contra la proteïna ECA-1 (ACE F940, BS3485, Bioworld Technology Inc., MN, EEUU) dil·luït 1/1000 en una solució de PBS amb 1% de llet desnatada en pols i 0.1% de detergent Tween 20 (PBS-T 1%). L'endemà es van rentar les membranes amb PBS-T 1% 4 vegades durant 5 minuts, i es van incubar durant 1 hora en la mateixa solució a temperatura ambient i agitació suau, amb l'anticòs secundari Goat anti-Rabbit (H+L, HRP conjugate, 31460, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies) dil·luït 1/2000 en PBS-T 1%. Després de rentar de nou les membranes amb PBS-T 1% (4 vegades), es van revelar mitjançant quimioluminescència amb el kit ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (34080, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies) i es van capturar les imatges amb l'equip LAS4000 imaging system (GE Healthcare, OH, EEUU). La detecció de quimioluminescència és possible gràcies a la reacció de la peroxidasa de rave (HRP), un enzim que es troba unit a l'anticòs secundari i que en presència del seu substrat (proporcionat pel kit ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate), reacciona i emet una senyal que pot ser detectada amb un sistema d'imatge digital.

Es van quantificar les bandes corresponents als pesos moleculars de 195 kilo Daltons (kDa) de les membranes revelades així com la densitat corresponen al carril de proteïna total marcat amb Ponceau S amb el software ImageJ 1.48v (US. National Institutes of Health). La densitat de cada banda de proteïna de 195 kDa (ECA-1) es va normalitzar per la densitat del seu carril corresponen a la proteïna total tenyida amb Ponceau S<sup>364</sup>. Els resultats s'han expressat en unitats arbitràries (U.A.).

### 3.2.13. Quantificació de l'expressió de miRNA a l'aorta

El teixit aòrtic prèviament congelat es va homogeneïtzar amb un polítró Omni Tissue Homogenizer TH (Omni International) amb el reactiu Trizol® (Invitrogen, Life Technologies). L'ARN total es va purificar mitjançant columnes amb el kit mirVana (AM1560, Ambion, Life Technologies) seguint les instruccions del fabricant. Aquest kit està dissenyat per purificar ARN adequat per a l'estudi de miRNA. El kit utilitza una extracció orgànica seguida d'una immobilització d'ARN en filtres de fibra de vidre per tal de purificar ARN total d'alta qualitat que conté ARN de mida petita.

L'avaluació de la qualitat i la quantitat d'ARN extret és molt important per la reproducibilitat i precisió dels posteriors anàlisis. En primer lloc es va analitzar la integritat de l'ARN mitjançant el sistema d'electroforesis capil·lar automatitzat 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, EEUU). La integritat es mesura amb el número RIN (1-10), el qual reflecteix la degradació de la mostra d'ARN (1 correspon a l'ARN degradat i 10 a l'ARN íntegre). La concentració d'ARN total de les mostres es va quantificar per fluorimetria amb el sistema Qubit (Invitrogen, Life Technologies). La concentració de la molècula diana (ARN) dins de la mostra es quantifica a través d'una sonda que emet una senyal fluorescent únicament quan s'uneix a la diana, minimitzant els efectes dels contaminants.

#### 3.2.13.1. Array d'expressió de miARN d'aorta

Es va utilitzar l'*Affymetrix rat miRNA 4.1 array* (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific) per tal d'obtenir el perfil d'expressió d'un total de 728 miARNs madurs i 490 pre-miARNs en 16 mostres d'aorta toràcica (SED n=5, MOD n=6 i INT n=5). Aquest anàlisi va ser realitzat per la Plataforma de Genòmica Funcional de l'IDIBAPS (*Genomics Core Facility*, CEK, Barcelona). El *microarray* és un mètode basat en la hibridació mitjançant col·leccions de sondes que permet l'anàlisi de diferents mostres al mateix moment. El mètode d'hibridació es basa en una lligació enzimàtica d'un nucleòtid o un oligonucleòtid curt conjugat a un fluorocrom a l'extrem 3'-OH del miRNA, utilitzant l'enzim ligasa T4 RNA. Els microarrays són un mètode molt útil per comparar l'abundància relativa de miARNs específics entre diferents grups experimentals.

L'anàlisi i interpretació dels resultats obtinguts va ser realitzat en col·laboració amb la Plataforma de Bioinformàtica de l'IDIBAPS (CEK, Barcelona). Els resultats es van analitzar mitjançant l'anàlisi de components principals (PCA). Aquesta tècnica va ser desenvolupada per tal reduir la dimensionalitat d'un conjunt de dades per a poder-les representar en gràfics de dues o tres dimensions agrupant diverses variables de les dades en factors, o components<sup>365</sup>. L'ús del PCA permet determinar si la variabilitat dels miARNs representa un patró definit que correlaciona amb els grups de mostres i la detecció d'*outliers*. Les dades van ser normalitzades per RMA (*Robust Multi-array Average*) i analitzades a través de la plataforma R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) utilitzant el paquet "stats".

### 3.2.13.2. Validació per RT-PCR

Per tal de validar els resultats obtinguts en el *microarray*, es va quantificar l'expressió d'un total de 5 miARNs mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR). Els miARNs es van seleccionar d'acord amb si presentaven una expressió diferencial entre els grups experimentals (FDR, *False Discovery Rate*<0.05; logRatio>0.6). Els miARNs analitzats es troben llistats a la taula 2.

D'acord amb les instruccions del fabricant, es va obtenir ADN complementari (ADNc) a partir de 10 ng d'ARN total mitjançant transcripció reversa (RT) utilitzant el kit TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Aquest kit utilitza la formació de pics amb cues poli-A a l'extrem 3' i la lligació a l'extrem 5' d'una seqüència d'un adaptador o primer per estendre per cada extrem els miRNAs madurs presents a cada mostra abans de la RT. Tots els miRNAs madurs de la mostra es transcriuen inversament a ADNc i amplifiquen de manera uniforme amb la quantitat d'ADNc present en cada mostra.

Seguidament, es va utilitzar el TaqMan® Fast Advanced Master Mix i sondes específiques de miRNA TaqMan® Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) per a la realització de la RT-PCR en plaques de 384 pous. En cada reacció, es van analitzar un total de 5 miARN d'interés així com dos controls endògens o *housekeeping* (miR-103-3p i miR-26a-5p) amb expressió homogènia entre els grups experimentals i que van ser seleccionats prèviament a partir de l'anàlisi de *microarray* (Taula 2). Els resultats es van analitzar mitjançant quantificació relativa pel mètode comparatiu de Ct (*threshold cycle*). Aquest mètode es basa en l'ús d'un o més miARNs o *housekeepings* que s'expressen igual en totes les condicions o grups experimentals i d'altra banda en que l'eficiència d'anellament dels primers és la mateixa per tots els miARNs. Els resultats de la RT-PCR (Ct de cada miARN d'interés) van ser normalitzats per la mitjana dels Ct dels miARNs *housekeeping* (miR-103-3p i miR-26a-5p) i després es

va normalitzar per una mostra de referència. En el nostre estudi es va utilitzar el valor mitg del Ct del miARN d'interès del grup SED normalitzat prèviament pel *housekeeping*, seguint les següents fórmules:

$$\Delta Ct = Ct (\text{miARN diana}) - Ct (\text{miARN } housekeeping)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{mostra}) - \Delta Ct (\text{referència})$$

$$Fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 3.2.13.3. Anàlisi de xarxes i interaccions

Es va fer una representació gràfica dels gens diana predits de cada miARN amb l'algoritme de predicció microT-CDS de DIANA Tools<sup>366</sup> i la interacció entre ells amb el software Cytoscape<sup>367</sup>. Per crear la xarxa es van seleccionar els gens predits de cada miARN amb un miTG score >0.98. També es va fer una recerca bibliogràfica d'articles científics publicats al *Pubmed* que relacionaven l'expressió d'aquests miARNs amb el remodelat vascular. Finalment, per tal d'estudiar la funcionalitat dels miARNs, es va fer una cerca de les vies de senyalització relacionades amb els miARN seleccionats amb l'eina MirPath<sup>368</sup> de DIANA Tools (*KEGG analysis*), utilitzant l'algoritme TarBase v7.0<sup>369</sup>, el qual es basa en articles publicats amb miARNs validats. Els resultats es van representar amb el software Cytoscape.

Taula 2. Sondes de miARN utilitzades per a la RT-PCR.

Sonda	ID	Seqüència	Referència TaqMan
rno-miR-132-3p	MIMAT0000838	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	rno480919_mir
rno-miR-212-3p	MIMAT0000883	UAACAGUCUCCAGUCACGGCCA	rno478318_mir
rno-miR-146b-5p	MIMAT0005595	UGAGAACUGAAUJCCAUAAGGCUGU	rno480941_mir
rno-miR-326-5p	MIMAT0017028	GGGGGCAGGGCCUUJUGUGAA	rno481449_mir
rno-miR-29b-3p	MIMAT0000801	UAGCACCAUUJGAAAUCAGUGUU	rno481300_mir
rno-miR-103-3p	MIMAT0000824	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	rno478253_mir
rno-miR-26a-5p	MIMAT0000796	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	rno481013_mir

### 3.2.14. Estudi de reactivitat vascular de l'aorta

Per a l'estudi de la reactivitat vascular es va utilitzar la tècnica de la miografia, que permet estudiar la funció vascular en segments de vasos *ex vivo*. Aquest mètode va ser desenvolupat l'any 1977 per Mulvany i Halpern<sup>370</sup> amb l'objectiu de mesurar les respostes vasomotores de vasoconstricció o vasodilatació a diferents substàncies o procediments.

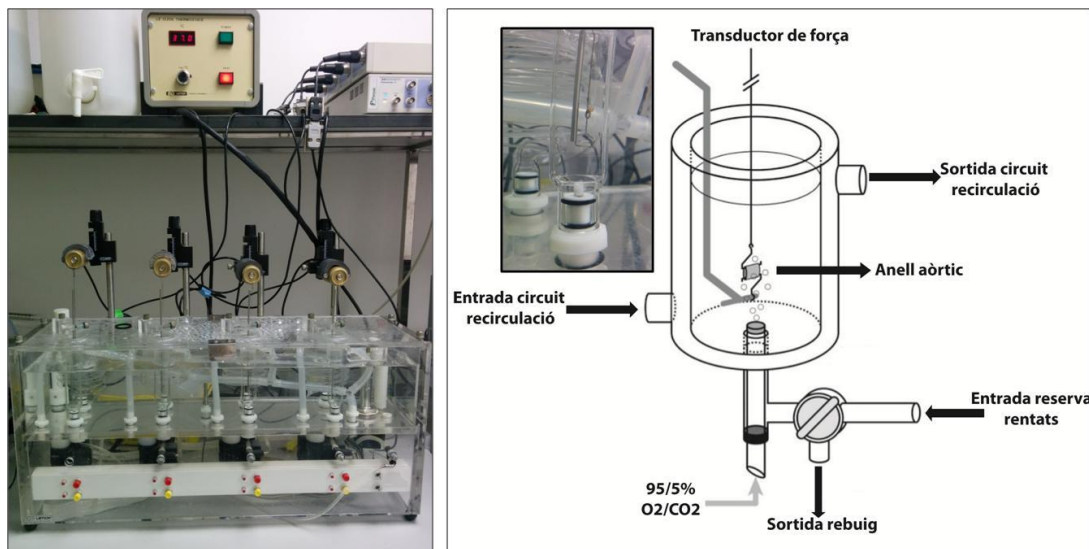
Els segments dels vasos es mantenen dins d'un bany d'òrgans a 37°C i es munten al voltant d'un filferro d'alumini que travessa la llum del vas i que està connectat a un transductor que registra els canvis de força o tensió isomètrica desenvolupats pel vas en diferents condicions. Les respostes poden ser utilitzades per predir l'efecte sobre la pressió sanguínia de diferents substàncies i també pot ser útil per l'estudi del paper del calci intracel·lular regulador del to vascular. A la vegada permet estudiar canvis de funció vascular promoguts per diferents situacions patològiques.

En aquest estudi, es va analitzar la resposta vasodilatadora de l'aorta toràcica al carbacol (Cch) (C4382, Sigma-Aldrich) i la resposta vasoconstrictora a la fenilefrina (FE) (P6126, Sigma-Aldrich) en condicions fisiològiques (endoteli intacte) i també amb la presència de l'inhibidor de l'eNOS *N<sub>w</sub>*-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NMMA) (N5751, Sigma-Aldrich). El Cch és un agonista colinèrgic, que mimetitzava els efectes de l'ACh, un neurotransmissor alliberat pels nervis parasimpàtics (colinèrgics) presents en molts vasos (p.ex.: aorta, artèries coronàries). El Cch s'uneix als receptors muscarínics acoblats a proteïna G presents a l'endoteli i a les VSMCs i té una funció vasodilatadora a través de la formació de NO. La FE és un agonista- $\alpha_1$  (simpaticomimètic) i provoca vasoconstricció de les VSMCs.

### **3.2.14.1. Preparació dels anells aòrtics**

Després de l'eutanàsia dels animals, es va extreure un segment d'aorta toràcica descendent i es va col·locar ràpidament en una solució fresca de Krebs-Henseleit (KBSS) a 4°C (mM: NaCl 119; KCl 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; MgCl<sub>2</sub> 1.2; CaCl<sub>2</sub> 1.6; NaHCO<sub>3</sub> 24; glucosa 11; EDTA 0.026, pH 7.3–7.4). Seguidament l'aorta es va netejar cuidadosament de teixit adipós i teixit connectiu amb l'ajuda d'un microscopi estereoscòpic Leica MZ6 (Leica microsystems), evitant danyar la capa muscular i l'endoteli del vas. Un cop neta, l'aorta es va tallar en anells de 4 mm. Els anells d'aorta es van muntar en ganxos d'acer inoxidable i es van col·locar dins d'un bany d'òrgans de quatre càmeres (Letica, Barcelona, Espanya) amb solució KBSS (20 ml) a 37°C, connectat a una bomba de gas carbogen (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) (Figura 28). Els canvis de força isomètrica van ser detectats i enregistrats per un aparell d'adquisició de dades PowerLab 4/30 (ADInstruments, Castle Hill, Austràlia), i visualitzats a temps real amb el software LabChart v7.3.7.

Inicialment es van estirar els anells aòrtics a una tensió basal de 1500 mg, la qual s'havia determinat en estudis preliminars com a tensió basal òptima per aquest vas. Durant aproximadament una hora es van realitzar rentats de la solució KBSS cada 15 min amb solució fresca, per establir la tensió basal abans de començar l'estudi. Un dels anells aòrtics de cada animal es va pre-incubar amb L-NMMA a una concentració de  $10^{-4}$  M, 30 min previs a l'inici de l'estudi, amb l'objectiu d'analitzar el paper de l'NO en la resposta vascular a les diferents substàncies.



**Figura 28. Bany d'òrgans i miògraf per l'estudi de reactivitat vascular.** A la dreta (imatge superior) s'observa una ampliació de la imatge de l'esquerra que correspon a una de les càmeres del bany amb un segment d'aorta col·locat al seu interior. A la dreta s'observa un esquema del funcionament del sistema: el ganxo d'acer inoxidable que conté l'anell aòrtic va connectat a un transductor que enregistra els canvis de força isomètrica. El sistema d'entrada i sortida permet la recirculació i els rentats de la càmera.

### 3.2.14.2. Corbes dosi-resposta

Per analitzar la resposta de relaxació al Cch, es van pre-controure els anells aòrtics amb FE a una dosi de  $10^{-6}$  M, i seguidament es van anar afegir dosis creixents de Cch ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) en intervals de 5 min per tal d'assolir una resposta màxima per a cada dosi. Un cop afegida la última dosi de Cch, es va realitzar un nou període d'estabilització de la tensió a 1500 mg amb rentats amb solució KBSS fresca cada 15 min, durant 60 min. Es va afegir el tractament amb L-NMMA en un dels anells aòrtics durant el període d'estabilització (als 30 min) i es va mantenir sense fer rentats amb KBSS fins a l'inici de cada corba dosi-resposta. A continuació, es va començar la corba de dosi-resposta a la FE, afegint dosis creixents des de  $10^{-10}$  M fins a la dosi més alta de  $10^{-5}$  M, en intervals de 5 min.

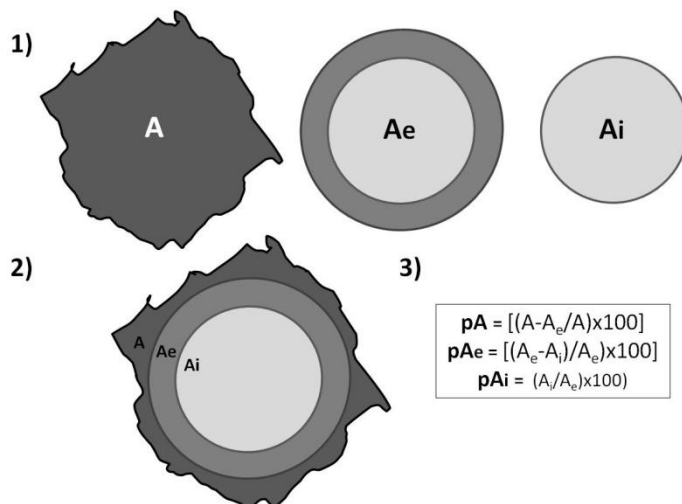
L'anàlisi es va realitzar amb el software GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU) ajustat a un model de tres paràmetres. Les dades es van incorporar a un model de regressió no lineal amb el mètode *Least squares (ordinary) fit*, el qual

representa en l'eix de les X el logaritme de la dosi del fàrmac, i en l'eix de les Y la resposta obtinguda, seguint una resposta típica amb forma sigmoidea. Per a cada grup, es va calcular el 50% de la resposta màxima obtinguda ( $EC_{50}$ ) i la resposta màxima ( $E_{max}$ ). L'equació utilitzada en aquest model s'anomena corba de dosi-resposta de tres paràmetres:

$$Y = \text{màxima resposta} + (\text{màxima resposta} - \text{mínima resposta}) / (1 + 10^{-(\text{Log}EC_{50} - X)})$$

### 3.2.15. Estudi morfomètric de vasos intramiocàrdics

Es van realitzar seccions transversals de 4  $\mu\text{m}$  a nivell mig ventricular, amb un micròtom Leica RM2125RT (Leica microsystems). Es va realitzar una tinció amb vermell de picrosirius de les seccions histològiques (4  $\mu\text{m}$ ) de cor a nivell mig. Es van obtenir fotografies (10X) d'àrees representatives tant de VD com del VE de cada mostra i es van localitzar els vasos intramiocàrdics amb àrees compreses entre 55-83.152  $\mu\text{m}^2$ . Es van obtenir les següents mesures: àrea perivascular ( $A$ ), limitada per la túnica adventícia; l'àrea externa ( $A_e$ ), limitada per la làmina elàstica externa de la túnica mitja; i l'àrea interna ( $A_i$ ), limitada per la làmina elàstica interna de la túnica mitja. El percentatge de l'àrea de la llum arterial relatiu a l'àrea de cada vas es va calcular a partir de la fórmula  $(A_i/A_e) \times 100$ , el percentatge de l'àrea de la túnica mitja es va calcular a partir de la fórmula  $[(A_e - A_i)/A_e] \times 100$  i finalment, el percentatge de fibrosi perivascular es va calcular a partir de la fórmula  $[(A - A_e)/A_e] \times 100$ . Es van analitzar un total de 10-15 vasos per cada mostra corresponent a un animal, tant del VD com del VE. La figura 29 mostra un esquema explicatiu de l'anàlisi realitzat. Els resultats es van representar com la mitjana de cada paràmetre mesurat en els vasos dels ventricles conjuntament (VD i VE). La quantificació es va realitzar amb el software ImageJ 1.48v.



**Figura 29. Esquema representatiu de l'anàlisi morfomètric dels vasos intramiocàrdics.** 1) A la part superior de l'esquema es mostren les àrees ( $A$ ,  $A_e$  i  $A_i$ ) calculades inicialment. 2) Superposició de les 3 àrees analitzades. 3) Càlculs del percentatge (%) de l'àrea de fibrosi perivascular ( $pA$ ), de la túnica mitja ( $pA_e$ ) i de la llum vascular ( $pA_i$ ) relatives a l'àrea total del vas ( $A_e$ ).

### 3.2.16. Anàlisi estadístic

Les variables contínues s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana (EEM) o mediana i quartils 25-75, depenent de la distribució de normalitat, analitzada prèviament mitjançant la gràfica Q-Q. La majoria de comparacions entre els grups experimentals (SED, MOD i INT) es van realitzar amb un anàlisi de variància ANOVA d'un factor. Les dades obtingudes de les mesures dels pesos de les rates així com dels vasos intramiocàrdics es van incorporar en un model lineal d'efectes mixt en el software SPSS v16.0 (SPSS Institute Inc, Cary, NC, EEUU), en el qual es van considerar els efectes principals i totes les interaccions possibles. En el cas d'obtenir un valor p significatiu en l'anàlisi general, tant fos en el resultat de la interacció o en el factor principal, es van realitzar comparacions post-hoc ajustades mitjançant LSD (*least significant differences*). Per l'anàlisi de la correlació entre la PP i la pulsatilitat de l'aorta, es va obtenir el coeficient de correlació de *Pearson*. Les variables categòriques es van expressar com a n (%). Les comparacions es van realitzar mitjançant el test exacte de Fisher's. L'anàlisi estadístic es va dur a terme amb el software GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU). Un valor  $p < 0.05$  es va considerar significatiu.

Per a l'anàlisi dels resultats de la reactivitat de l'aorta es van comparar els valors de  $EC_{50}$  i  $E_{max}$  de cada grup experimental (SED, MOD i INT) en cadascuna de les corbes dosi-resposta, mitjançant el mètode *Extra sum of squares F test*. Un valor  $p < 0.05$  es va considerar significatiu.

Finalment, l'anàlisi estadístic de les dades del microarray es va realitzar utilitzant un test no-paramètric (RankProd)<sup>371</sup> proporcionat pel paquet "RankProd" de la plataforma R. Els miRNAs amb expressió diferencial entre dos grups experimentals es van definir amb un FDR (False Discovery Rate)  $< 0.05$  i un logRatio  $> 0.6$ .



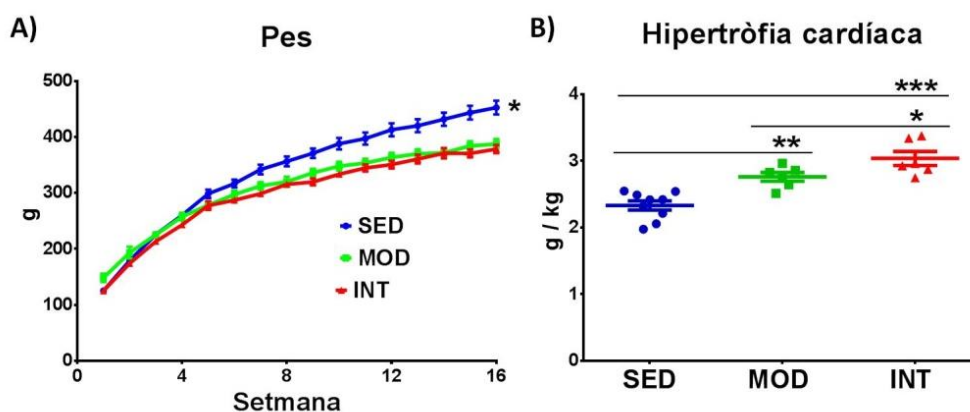
### 3.3. RESULTATS

#### 3.3.1. Adaptació fisiològica a l'exercici

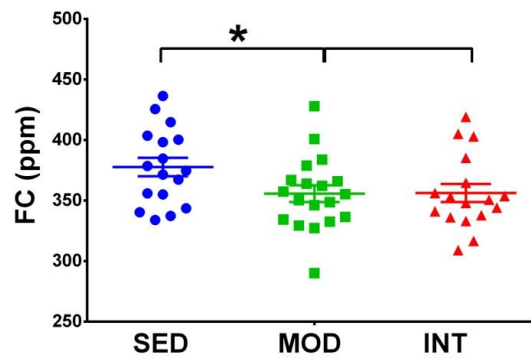
En primer lloc es va analitzar l'evolució de pes dels animals al llarg de les 16 setmanes en els tres grups experimentals. Tal i com s'observa en la figura 30 A, tant l'exercici moderat com l'exercici intens van associar-se a un menor guany ponderal en comparació amb el grup SED. Aquesta diferència de pes es comença a observar a partir de la setmana 6 aproximadament i es manté de manera gradual i constant al llarg de cada setmana fins al final de l'experiment. L'increment de pes dels animals sotmesos a exercici intensiu i moderat presenta una evolució molt similar al llarg de les 16 setmanes.

Per altra banda, i tal i com es pot observar a la figura 30 B, a les 16 setmanes el pes del cor en relació al pes de cada animal va ser significativament diferent entre els grups exercici (MOD i INT) i el grup SED, indicant una hipertròfia cardíaca promoguda per l'exercici. A més, el grau d'hipertròfia cardíaca és més alt a major intensitat d'exercici, amb diferències significatives entre els dos grups d'exercici (Figura 30 B).

Finalment, els animals sotmesos a exercici van mostrar tenir una FC (pulsacions per minut, ppm) significativament més baixa en comparació amb els animals sedentaris (SED:378±8 ppm; MOD:356±7 ppm; INT:356±7 ppm), sense diferències significatives entre els dos grups d'exercici, tal i com s'observa en la Figura 31.



**Figura 30. Pesos dels animals i hipertròfia cardíaca associada a l'exercici. A)** Evolució dels pesos (g) de les rates dels grups SED (n=23), MOD (n=20) i INT (n=17) al llarg de les 16 setmanes. **B)** Anàlisi de l'hipertròfia cardíaca obtinguda a partir de la ràtio del pes del cor (g) en relació al pes de cada animal (kg) dels grups SED (n=9), MOD (n=6) i INT (n=6), a les 16 setmanes. \*p<0.05 ; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

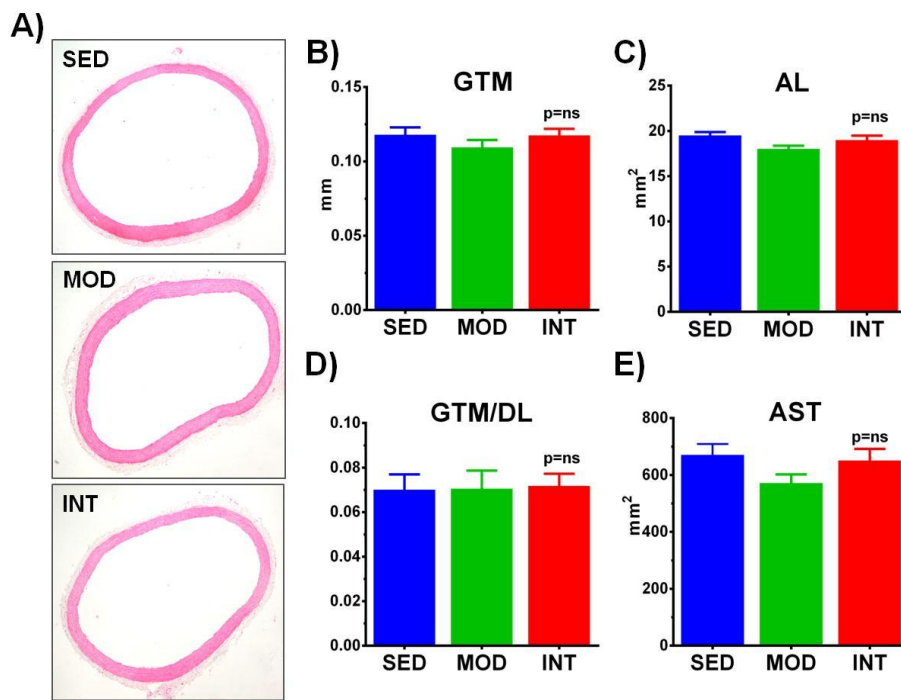


**Figura 31. Canvis en la freqüència cardíaca associats a l'exercici.** Freqüència cardíaca (ppm) dels grups SED (n=17), MOD (n=19) i INT (n=17), mesurada a les 16 setmanes. Els valors corresponen a la mitjana±EEM. FC: Freqüència cardíaca. ppm: pulsacions per minut. \*p<0.05.

### 3.3.2. Remodelat estructural de l'aorta

#### 3.3.2.1. Anàlisi morfomètric

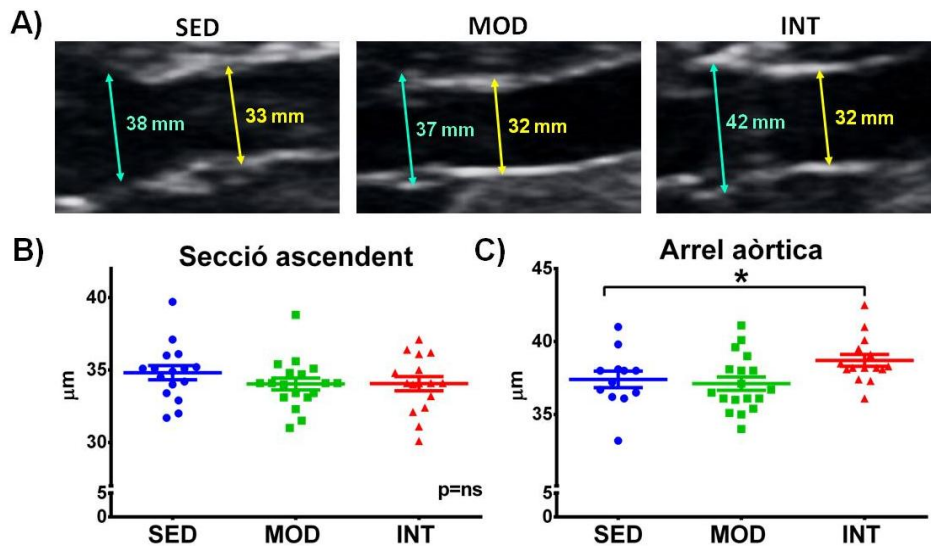
L'anàlisi morfomètric de l'aorta descendent no va mostrar diferències en cap dels paràmetres analitzats entre els tres grups experimentals: gruix de la túnica mitjana, (GTM), àrea de la llum vascular (AL), diàmetre de la llum vascular (DL), ràtio del gruix de la túnica mitjana entre l'àrea de la llum vascular (GTM/DL) i àrea de la secció transversal (AST, mm<sup>2</sup>) (Figura 32).



**Figura 32. Estudi morfomètric de l'aorta.** A) Imatges representatives de talls histològics d'aorta tenyits amb hematoxilina-eosina (40X) dels tres grups experimentals (SED, MOD i INT). B) Gruix (mm) de la túnica mitjana (GTM). C) Àrea (mm<sup>2</sup>) de la llum vascular (AL). D) Ràtio del gruix de la túnica mitjana per la llum vascular (GTM/DL). E) Àrea (mm<sup>2</sup>) de la secció transversal de l'aorta (AST). SED n=10; MOD n=6; INT n=8. Els valors corresponen a la mitjana±EEM. p=ns (valor p no significatiu).

### 3.3.2.2. Anàlisi ecocardiogràfic

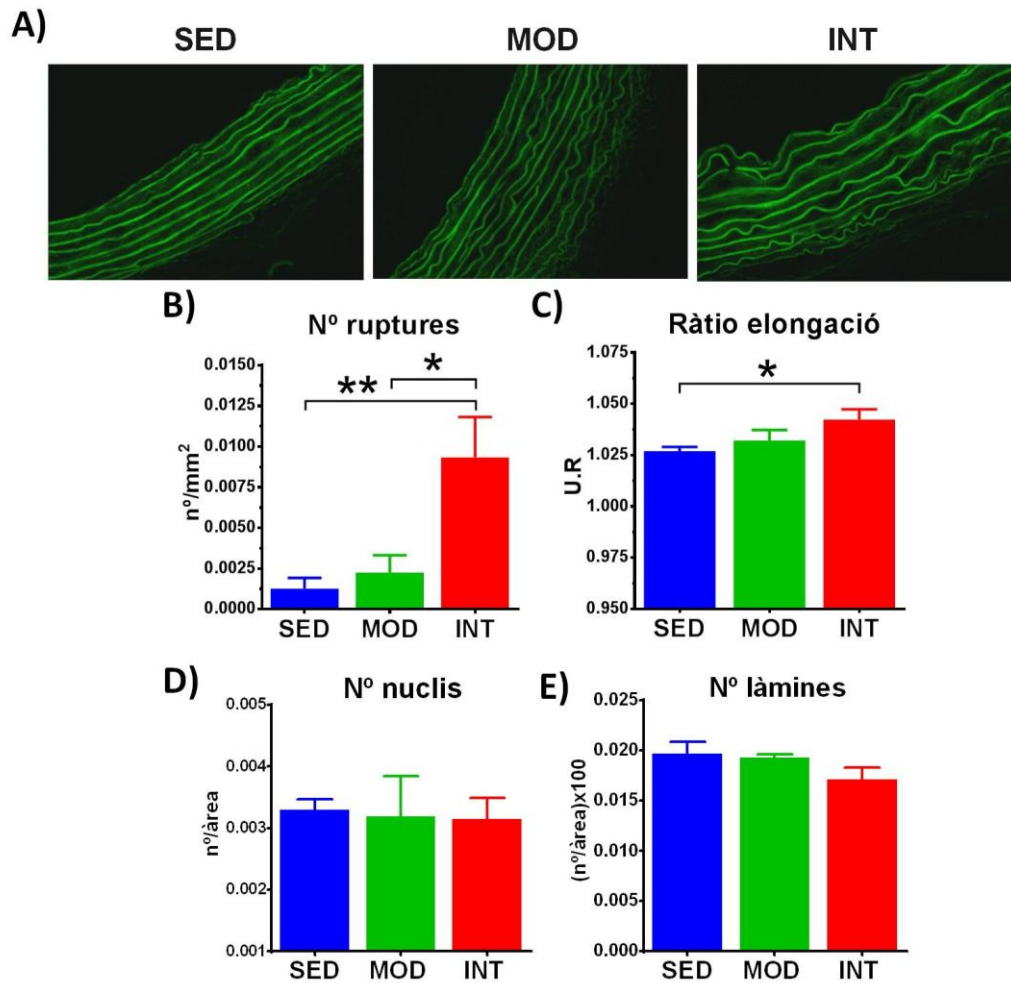
L'estudi ecocardiogràfic no va mostrar diferències en el diàmetres a nivell de l'aorta ascendent entre els diferents grups experimentals. Tanmateix, el grup INT va presentar un diàmetre a nivell de l'arrel aòrtica significativament superior en comparació amb el grup SED i amb una clara tendència superior en comparació amb el grup MOD (Figura 33).



**Figura 33. Estudi ecocardiogràfic de l'aorta ascendent.** A) Imatges representatives de l'ecocardiograma a d'un animal de cada grup experimental, amb el valor del diàmetre (mm) de l'arrel aòrtica (color blau) i de la secció ascendent (color groc). B) Diàmetre sistòlic (mm) de la secció ascendent (SED n=11; MOD n=18; INT n=15). C) Diàmetre sistòlic (mm) de l'arrel aòrtica (SED n=12; MOD n=17; INT n=16). Els valors corresponen a la mitjana±EEM, \*p<0.05.

### 3.3.2.3. Anàlisi de les làmines elàstiques de l'aorta

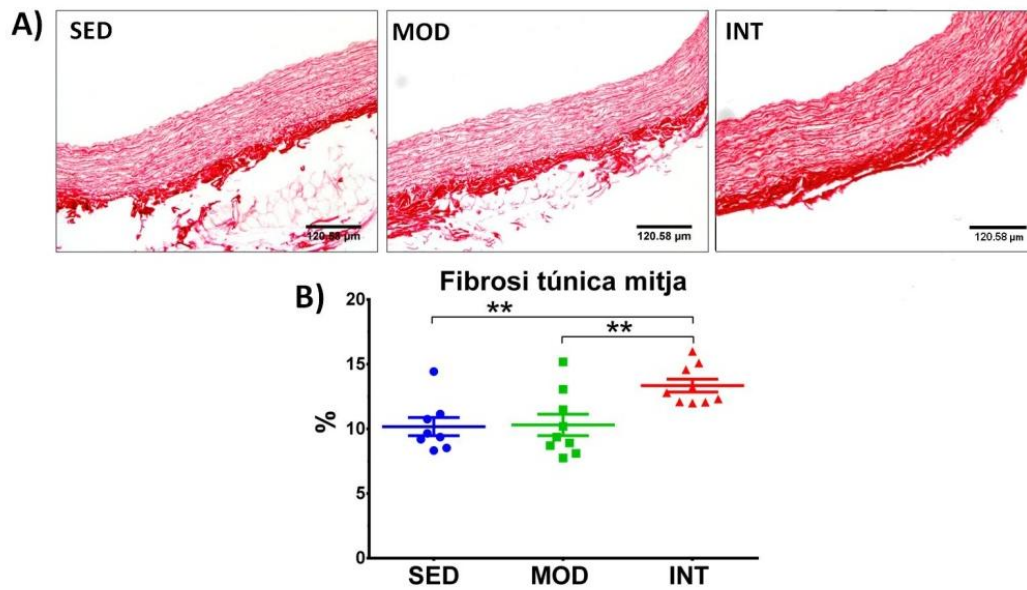
Els resultats van mostrar un increment significatiu del número de ruptures de làmines elàstiques per àrea analitzada en el grup INT, en comparació amb els grups MOD i SED (Figura 34 B). A més, l'exercici intens va provocar un augment significatiu de l'elongació de les làmines elàstiques respecte als dos altres grups, reflectint una forma menys lineal de les làmines elàstiques. De forma contrària, no es van trobar diferències en el número de nuclis cel·lulars, corresponents a les cèl·lules musculars llises de la túnica media, entre els grups experimentals (Figura 34 D). Finalment la quantificació del número de làmines elàstiques normalitzat per l'àrea no va ser diferent en els grups SED, MOD i INT (Figura 34 E).



**Figura 34. Estudi de les làmines elàstiques de l'aorta.** **A)** Imatges representatives de l'autofluorescència (492-518 nm) de les làmines elàstiques de la túnica mitjana (40x). **B)** Número de ruptures de làmines elàstiques per àrea de la túnica mitjana (n°/mm<sup>2</sup>). **C)** Ràtio d'elongació de les làmines elàstiques de la túnica mitjana (U.R.) **D)** Quantificació del nombre de cèl·lules musculars llises vasculars (VSMCs) normalitzat per l'àrea de la túnica mitjana. **E)** Quantificació del nombre làmines elàstiques normalitzat per l'àrea de la túnica mitjana. SED n=9; MOD n=7; INT n=7. \*p<0.05, \*\*p<0.01. U.R: Unitats Relatives.

### 3.3.2.4. Anàlisi de la fibrosi de l'aorta

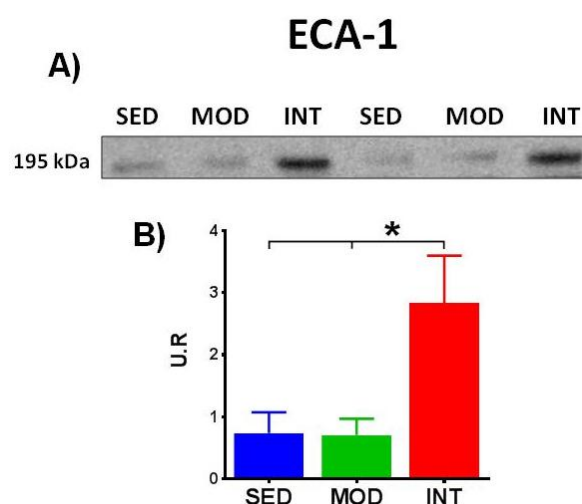
Tal i com es pot observar a la figura 35, les aortes del grup INT van mostrar un augment significatiu del percentatge de col·lagen (%) de la túnica mitjana en comparació amb els grups MOD i SED.



**Figura 35. Fibrosi de la túnica mitja de l'aorta associada a l'exercici.** **A)** Imatges representatives de talls histològics d'aorta tenyits amb vermell de picrosirius (400x) dels tres grups experimentals (SED, MOD i INT). **B)** Percentatge de fibrosi de la túnica mitja (% col·lagen) (SED n=7; MOD n=9; INT n=9). Els valors corresponen a la mitjana±EEM. \*\*p<0.01.

### 3.3.2.5. Nivells de proteïna per Western Blot

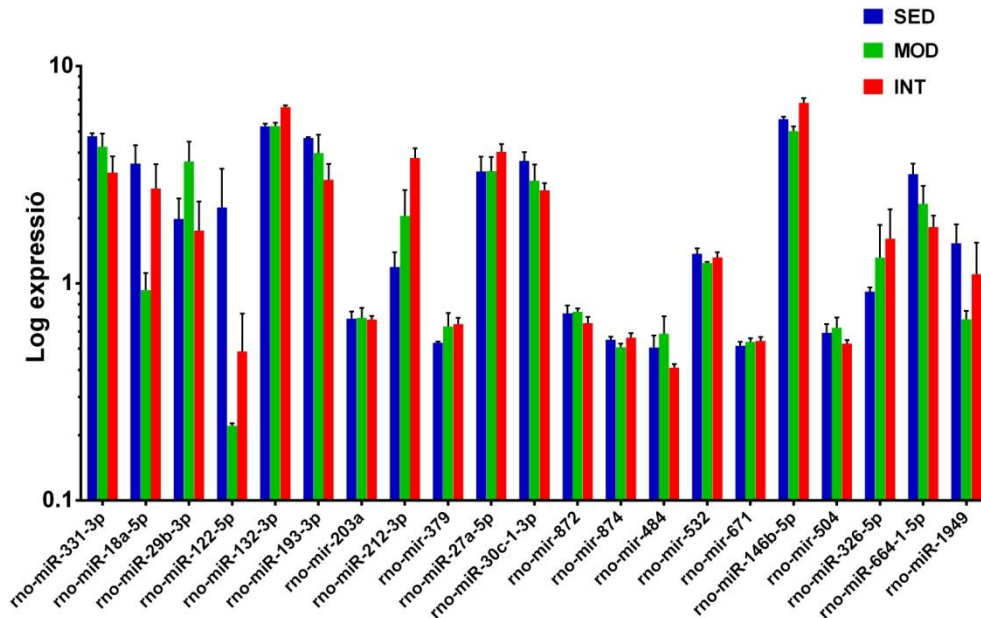
A partir de mostres congelades de teixit d'aorta, es va realitzar la tècnica de *Western Blot* per analitzar els nivells de la proteïna ECA-1, associada al remodelat estructural. Els resultats van mostrar un increment significatiu dels nivells de proteïna de l'ECA-1 en les aortes del grup INT, respecte als grups MOD i SED (Figura 36).



**Figura 36. Anàlisi dels nivells de proteïna per Western Blot.** **A)** Imatges representatives d'immunoblots d'ECA-1 (panell superior). **B)** Nivells de proteïna ECA-1 (U.R.) normalitzats per *Ponceau* (SED n=5; MOD n=7; INT n=4). Els valors corresponen a la mitjana±EEM. \*p<0.05. U.R.: Unitats Relatives.

### 3.3.2.6. Nivells d'expressió de miARNs

En primer lloc, es va analitzar l'expressió del *microarray* en un total de 16 mostres d'aorta toràcica (SED n=5, MOD n=6, INT n=5). Un total de 21 miRNAs únics van presentar una expressió diferencial entre grups (Figura 37). La mostra R22 es va classificar com a *outlier* i es va descartar dels posteriors anàlisis estadístics.

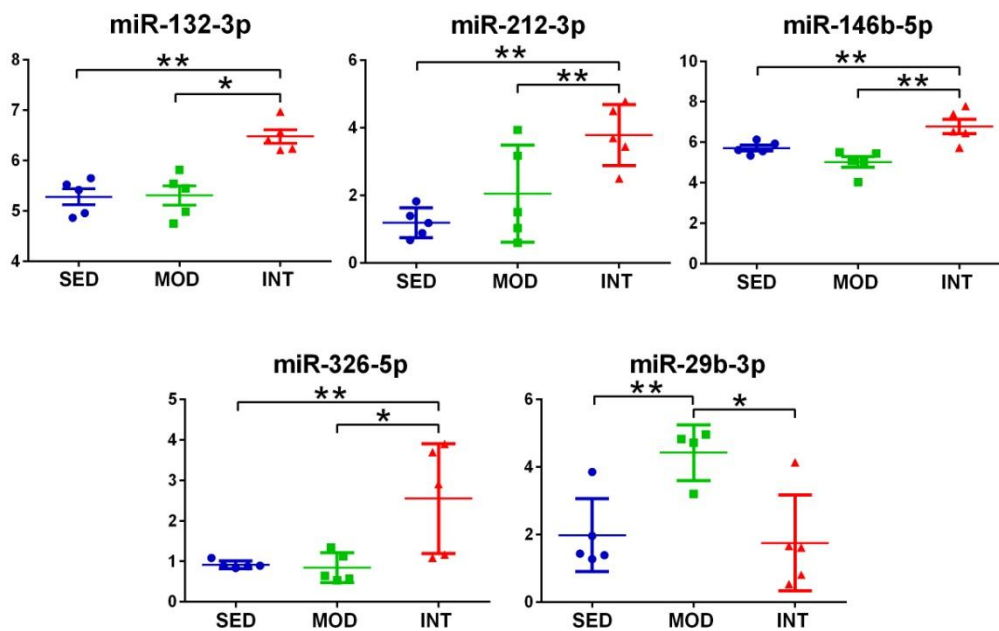


**Figura 37. Expressió de miARNs en mostres d'aorta.** El gràfic mostra l'expressió (Log expressió) de 21 miARNs obtinguda amb el *microarray* dels tres grups experimentals (SED n=5, MOD n=6, INT n=5). Els valors corresponen a la mitjana±EEM.

Del total de miARNs amb expressió diferencial, es va observar una sobreexpressió de 4 miARNs a les aortes del grup INT en comparació amb els grups SED i MOD (miR-132-3p, miR-212-3p, miR-146b-5p, miR-326-5p). D'altra banda, el miR-29b-3p es va trobar elevat de manera significativa en el MOD en comparació amb els grups SED i INT (Taula 3 i Figura 38).

**Taula 3. miARNs diferencialment expressats entre els grups experimentals.** FRD (*False Discovery Rate*).

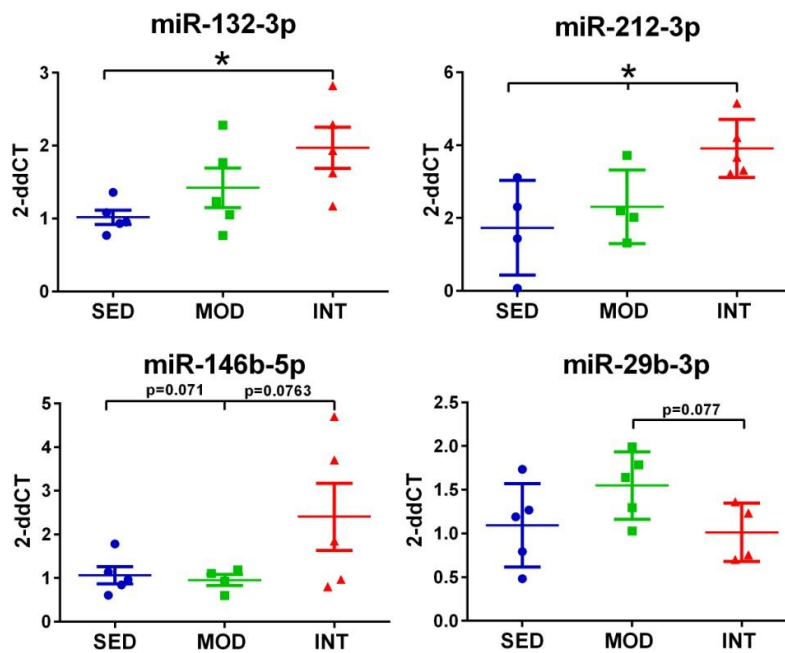
	SED vs INT		SED vs MOD		MOD vs INT	
	logRatio	FDR	logRatio	FDR	logRatio	FDR
rno-miR-132-3p	1.09	0.00	<0,06	>0,05	0.96	0.01
rno-miR-212-3p	2.30	0.00	<0,06	>0,05	1.48	0.00
rno-miR-146b-5p	0.71	0.004	<0,06	>0,05	1.06	0.00
rno-miR-326-5p	1.43	0.00	<0,06	>0,05	1.09	0.01
rno-miR-29b-3p	<0,06	>0,05	1.58	0.00	-1.69	0.01



**Figura 38. Array d'expressió de miARNs en mostres d'aorta.** Gràfics dels nivells d'expressió dels miARNs (miR-132-3p, miR-212-3p, miR-146-5p, miR-326-5p i miR-29b-3p) seleccionats de l'anàlisi del microarray. SED n=5, MOD n= 5, INT=5. \*p<0.05, \*\*p<0.005.

Tal i com s'observa en la figura 39, la quantificació de l'expressió de miARNs per RT-PCR va donar lloc a un perfil d'expressió similar a l'observat al microarray. L'expressió del miR-132-3p es va trobar incrementada de manera significativa en el grup INT en comparació amb el grup SED, mentre que l'expressió del miR-212-3p va resultar ser més elevada de manera significativa en el grup INT en comparació amb els grups MOD i SED. Tot i que no es van observar diferències significatives entre grups, l'expressió del miR-146b-5p presenta una tendència a tenir una expressió més elevada al grup INT en comparació amb el grup SED ( $p=0.0710$ ) i al grup MOD ( $p=0.076$ ). Finalment, l'expressió de miR-29b-3p es va trobar augmentada en el grup MOD en comparació amb el grup INT, sense arribar a ser una diferència significativa ( $p=0.077$ ). L'expressió del miR-326-5p no es va poder validar per RT-PCR ja que els valors d'expressió eren molt baixos i per tant, no s'inclouen als resultats.

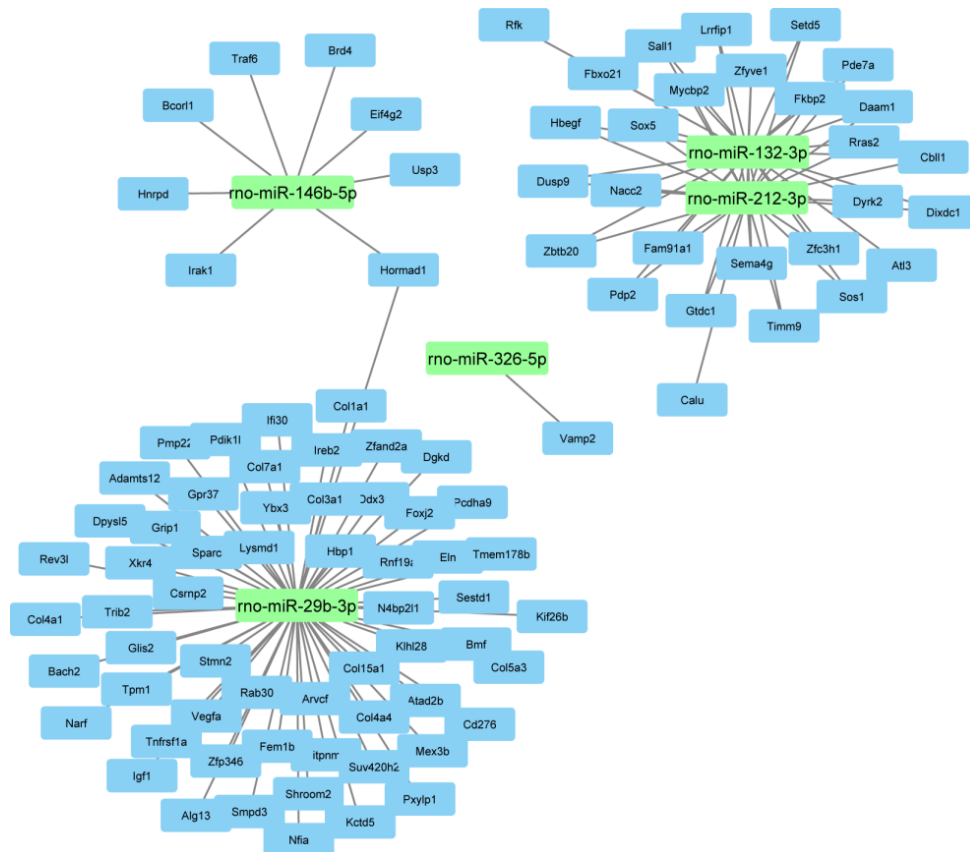




**Figura 39. Validació de l'expressió de miARNs per RT-PCR.** Quantificació relativa ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) de l'expressió dels miARNs: miR-132-3p, miR-212-3p, miR-146b-5p i miR-29b-3p. SED n=5, MOD n= 5, INT n=5. \*p<0.05.

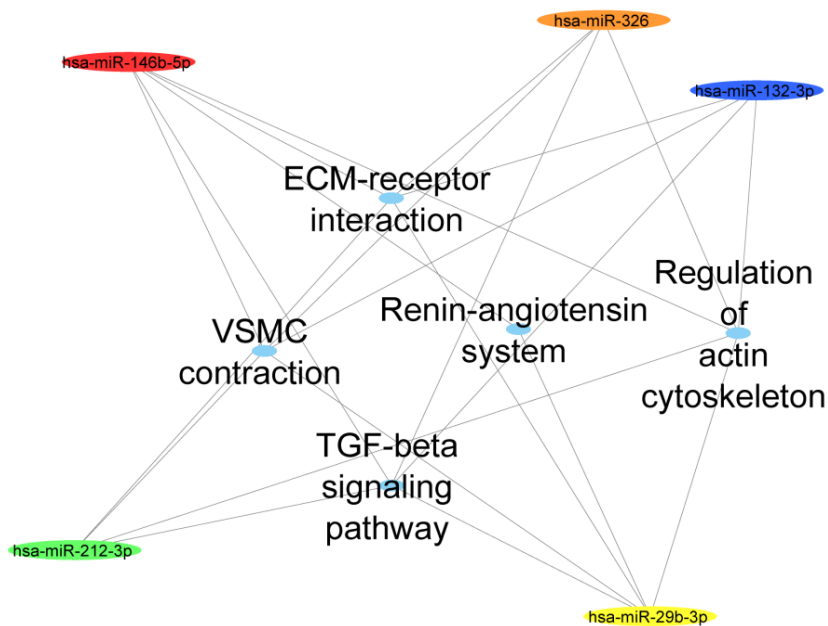
### 3.3.2.7. Anàlisi de xarxes i interaccions

Per tal de determinar quins eren els gens diana dels miARNs i quines eren les principals vies de senyalització que regulaven es va fer un anàlisi de xarxes i interaccions. Tal i com mostra la figura 40, els miR-132-3p i 212-3p podrien regular gens idèntics en excepció de dos (Rfk i Calu) que són regulats específicament per un dels dos miARNs. Aquest resultat concorden amb el fet de que aquests dos miARNs es transcriuen conjuntament i, per tant, poden reconèixer gens idèntics. Segons l'anàlisi de predicció, els miR-146b-5p i miR-29b-3p regularien un mateix gen (Hormad1), el qual codifica per una proteïna reguladora del cycle cel·lular. El mir-29b podria regular entre molts d'altres, els gens que codifiquen per les proteïnes de col·lagen 1 (Col1a1) i 3 (Col3a1), els dos principals tipus de col·lagens presents a l'aorta. Finalment, la base de dades només ha proporcionat informació sobre un únic gen probablement regulat pel miR-326-5p (Vamp2), que no estaria regulat per cap dels altres miARNs analitzats i que codifica per una proteïna que participa en la fusió de membrana durant l'excitació neuronal.



**Figura 40. Xarxa d'interaccions entre miARNs i gens diana.** Els rectangles verds representen els miARNs diferencialment expressats a l'aorta, mentre que els rectangles blaus representen els gens diana predits per aquests miARNs.

D'altra banda, la cerca de les vies de senyalització que regulen els miARNs en humans va mostrar una interacció força marcada entre els miARNs seleccionats (Figura 41). Entre les vies de senyalització regulades pels diferents miARNs podem trobar les que participen en la interacció amb la MEC, la contracció de les VSMCs, el sistema RAAS, la via de senyalització del TGF- $\beta$  o bé la regulació del citoesquelet d'actina.

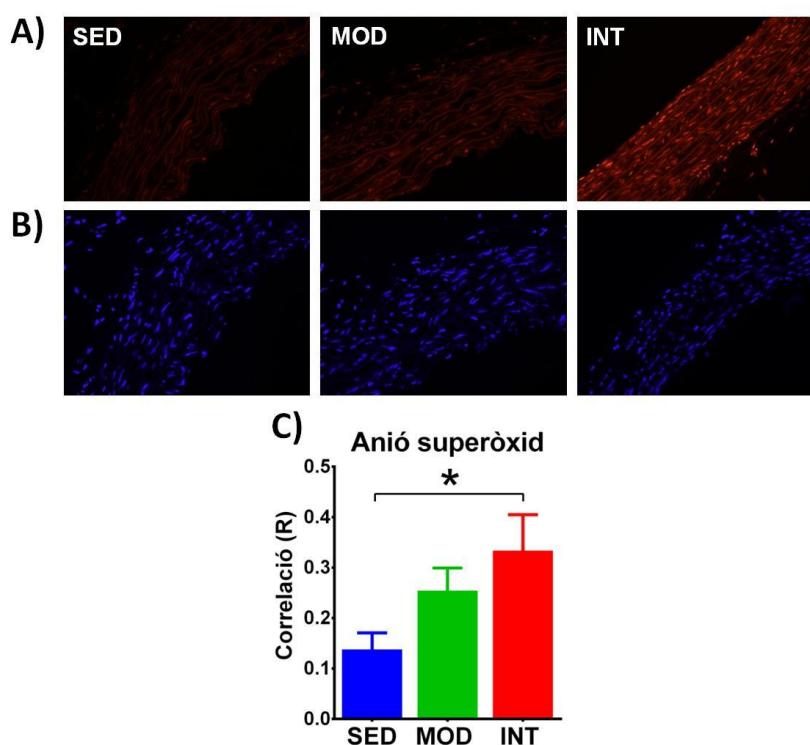


**Figura 41. Xarxa d'interaccions entre els miARNs i les vies de senyalització.** En colors es representen els miARNs diferencialment expressats i la interacció amb les vies de senyalització que regulen. ECM: matriu extracel·lular, VSMC: cèl·lula muscular llisa vascular.

### 3.3.3. Remodelat funcional de l'aorta

#### 3.3.3.1. Nivells d'estrès oxidatiu

La determinació de la producció d'anions superòxid de l'aorta mitjançant detecció del fluorocrom DHE del grup INT, va ser significativament més elevada respecte al grup SED, reflectint un augment d'estrès oxidatiu en les aortes d'aquest grup. Els resultats es mostren a la figura 42, on es poden observar imatges representatives de fluorescència dels tres grups experimentals.



**Figura 42. Anàlisi dels nivells d'estrès oxidatiu amb dihidroietidi (DHE). A)** Imatges representatives de fluorescència (490 nm) de seccions d'aorta en presència de DHE. **B)** Imatges representatives de fluorescència (350 nm) de les mateixes seccions d'aorta. **C)** Quantificació de la colocalització de la fluorescència vermella (DHE) i la fluorescència blava (DAPI), mitjançant el coeficient de correlació de Manders (R). (SED n=8; MOD n=7; INT n=6). Els valors corresponen a la mitjana±EEM. \*p<0.05.

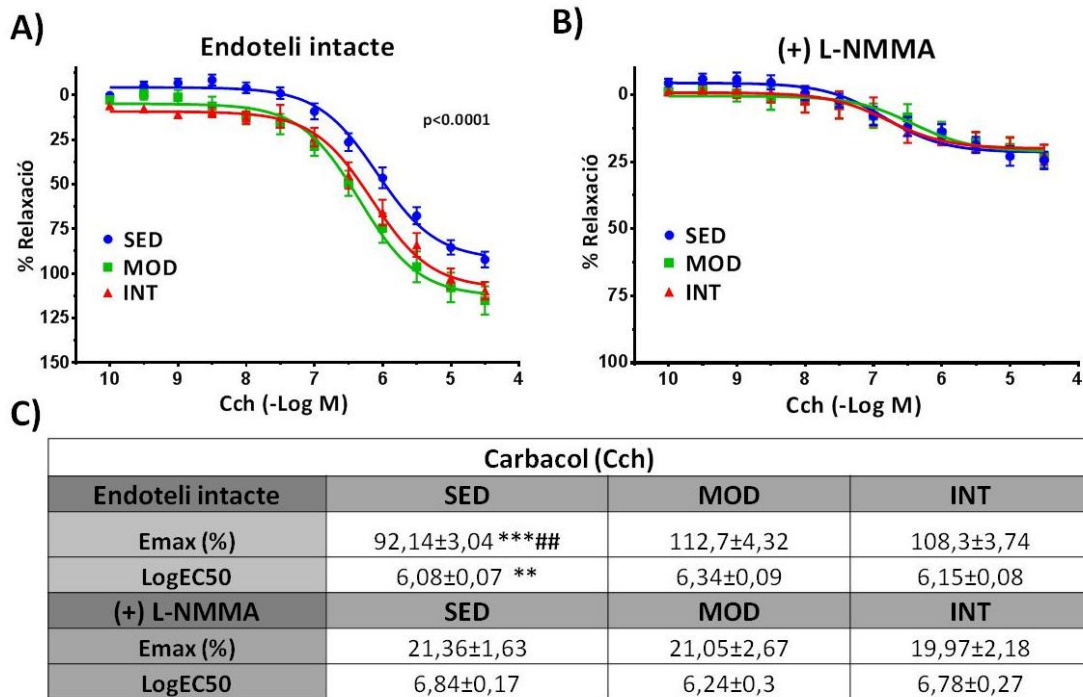
### 3.3.3.2. Reactivitat vascular de l'aorta

Es van realitzar estudis *ex vivo* de reactivitat vascular en anells aòrtics mitjançant miografia en bany d'òrgans amb l'objectiu d'analitzar la capacitat vasodilatadora i vasocontràctil en condicions on l'endoteli estava intacte (condicions fisiològiques), o amb la presència d'un inhibidor de la eNOS (L-NMMA).

#### Resposta vasodilatadora al Carbacol

Els anells aòrtics de les rates dels grups exercici (MOD i INT) van mostrar un increment significatiu de la resposta màxima al Cch comparats amb el grup SED (Figura 43 A). Aquest resultat suggereix una millora de la funció vascular promoguda per l'exercici. El logaritme de la  $EC_{50}$  també es va trobar incrementat significativament en el grup MOD respecte al grup SED. Per altra banda no es va observar cap diferència ni en la  $E_{max}$  ni en la  $EC_{50}$  entre els dos grups sotmesos a exercici, fet que suggereix que un increment en la intensitat de l'exercici no va acompanyat d'un augment de la millora de la funció vascular.

Quan es van incubar els anells aòrtics amb L-NMMA, tant la  $E_{max}$  com la  $EC_{50}$  van ser similars entre el grup control i els grups exercici (MOD i INT) (Figura 43 B), demostrant que la vasorelaxació al Cch de l'aorta depèn en gran part de l'endoteli ja que la inhibició de la producció d'NO, que prové principalment de les cèl·lules endotelials, és capaç de reduir la resposta vasodilatadora en un 70-90%.

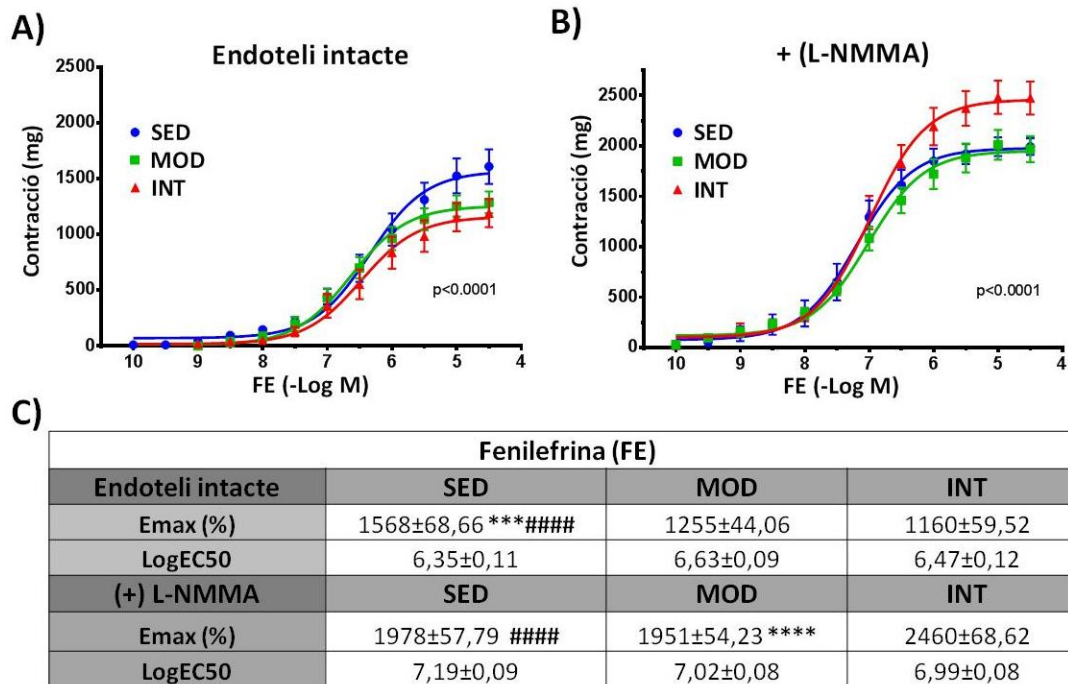


**Figura 43. Corbes de dosi-resposta al Carbacol ( $10^{-10}$ - $10^{-9}$  M) en anells aòrtics. A)** Corba de dosi-resposta al Carbacol (Cch) en condicions fisiològiques amb l'endoteli intacte (SED n=19; MOD n=21; INT n=11). \*\*\*p<0.001. **B)** Corba de dosi-resposta al Cch amb la presència d'un inhibidor de la NOS (L-NMMA) (SED n=20; MOD n=19; INT n=15). **C)** Taula amb els valors de la resposta màxima ( $E_{max}$ ) i del logaritme del valor mitjà (50%) de la concentració màxima efectiva (LogE50) calculats a partir de les corbes dosi-resposta al Cch, en condicions fisiològiques (endoteli intacte) i amb la presència d'un inhibidor de la NOS (L-NMMA). Els valors corresponen a la Mitjana±EEM. \*\*\* p<0.001 SED vs MOD, \*p<0.05 SED vs MOD, ## p<0.01 SED vs INT.

### Resposta vasocontràctil a la Fenilefrina

L'exercici d'intensitat moderada així com l'exercici d'alta intensitat van causar una disminució significativa de la resposta vasocontràctil de l'aorta induïda per la FE en comparació amb el grup SED (Figura 44 A). No es van observar diferències entre els dos grups d'exercici, ni amb els valors de  $E_{max}$  ni amb els valors de  $EC_{50}$ .

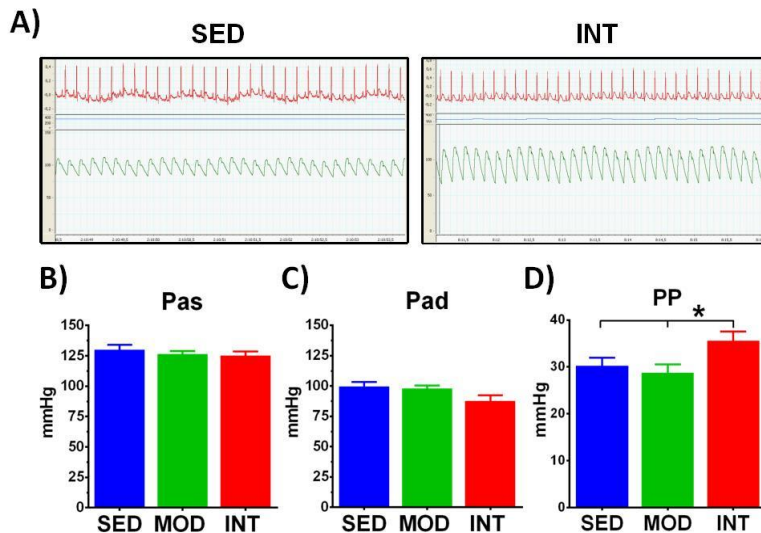
Amb la presència de L-NMMA, es va observar un augment ja esperat de la resposta vasocontràctil ( $E_{max}$ ) a la FE en tots els grups experimentals, donat que la falta de producció d'NO a l'endoteli en aquesta situació, no pot contrarestar els efectes de la FE. No obstant, mentre que les respostes dels grups SED i MOD es van igualar, l'increment de la resposta vasocontràctil de l'aorta del grup INT va ser significativament superior respecte als grups MOD i SED (Figura 44 B).



**Figura 44. Corbes de dosi-resposta a la Fenilefrina ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) en anells aòrtics. A)** Corba de dosi-resposta a la Fenilefrina (FE) en condicions fisiològiques amb l'endoteli intacte (SED n=9; MOD n=12; INT n=8). \*\*\* $p<0.0001$ . **B)** Corba de dosi-resposta a la FE amb la presència d'un inhibidor de la NOS (L-NMMA). \*\*\* $p<0.0001$ . **C)** Taula amb els valors de la resposta màxima ( $E_{max}$ ) i del logaritme del valor mitg (50%) de la concentració màxima efectiva (LogEC50) calculats a partir de les corbes dosi-resposta a la FE, en condicions fisiològiques (endoteli intacte) i amb la presència d'un inhibidor de la NOS (L-NMMA). Els valors corresponen a la Mitjana±EEM. \*\*\* $p<0.001$  SED vs MOD, ##### $p<0.0001$  SED vs INT, \*\*\*\* $p<0.0001$  MOD vs INT.

### 3.3.3.3. Estudi hemodinàmic

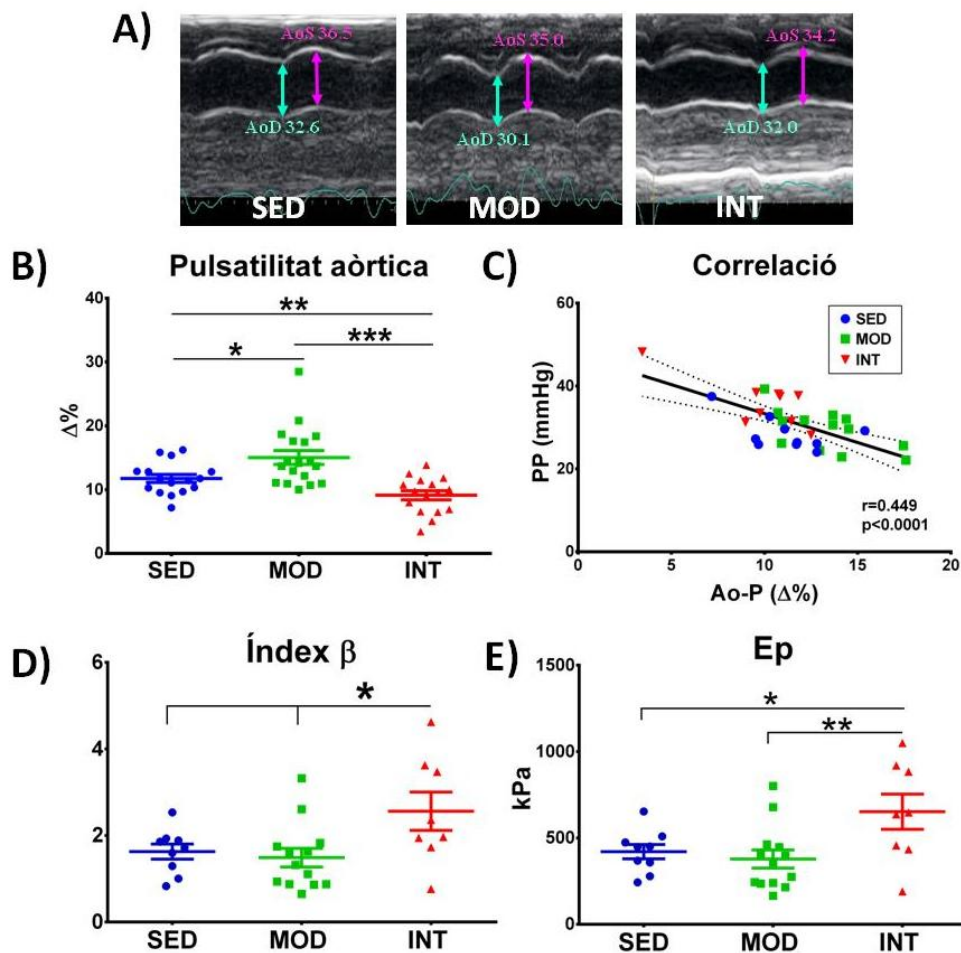
Els resultats obtinguts a partir de l'estudi hemodinàmic *in vivo* dels animals va mostrar que ni l'exercici d'intensitat moderada ni l'exercici d'alta intensitat van promoure diferències significatives en la Pas i Pad respecte al grup control (Figura 45 B i C). Tanmateix, quan es va analitzar la pressió del pols (PP=Pas-Pad) en aquests animals, es va observar un increment significatiu en el grup INT, respecte als grups SED i MOD (Figura 45 D).



**Figura 45. Estudi hemodinàmic *in vivo*.** A) Imatges representatives de registres de pressió sanguínia d'una rata sedentària (SED) i d'una rata sotmesa a exercici intens (INT). B) Pressió arterial sistòlica (Pas, mmHg) (SED n=8; MOD n=9; INT n=10). C) Pressió arterial diastòlica (Pad, mmHg) (SED n=8; MOD n=9; INT n=10). D) Pressió del pols (PP, mmHg). (SED n=8; MOD n=9; INT n=9). Mitjana±EEM, \*p<0.05.

### 3.3.3.4. Estudi ecocardiogràfic

L'anàlisi de la pulsatilitat a nivell de l'aorta ascendent va ser significativament superior en els animals sotmesos a exercici moderat en comparació amb el grup control SED (Figura 46 B). De forma contrària, els animals sotmesos a exercici intens van presentar una pulsatilitat de l'aorta ascendent significativament menor en comparació amb els animals del grup MOD. L'anàlisi del coeficient de correlació de *Pearson* entre la pressió dels pols mesurada en l'estudi hemodinàmic i la pulsatilitat mitjançant ecocardiografia va indicar una relació lineal negativa entre les dues mesures obtingudes en els estudis *in vivo* (Figura 46C). Finalment, l'estimació dels dos índexs de rigidesa (índex  $\beta$  i Ep) van resultar ser més elevats en les rates INT en comparació amb els grups MOD i SED (Figura 46, D i E).

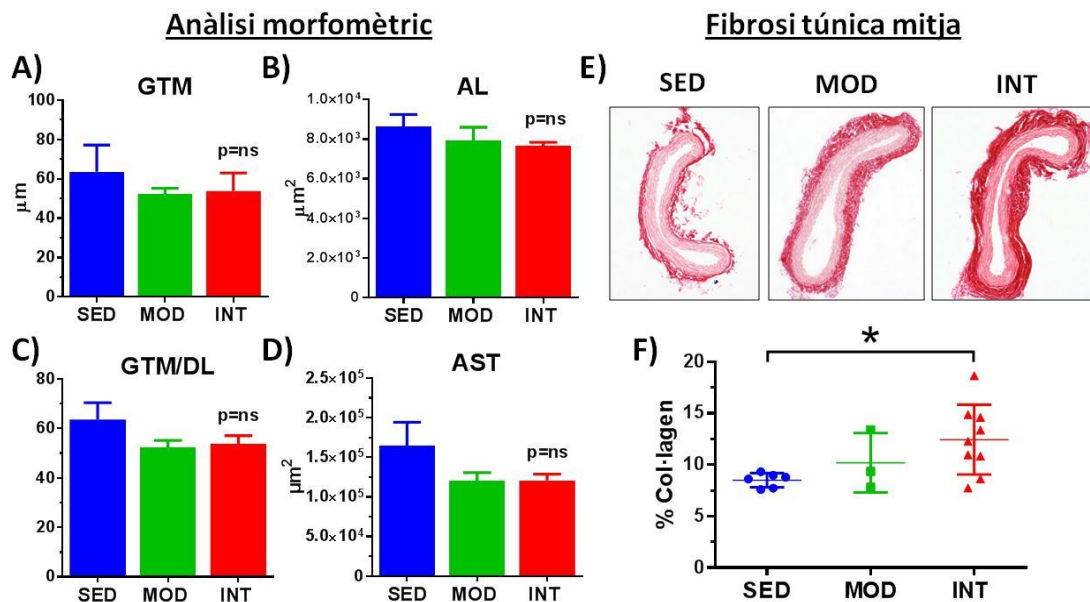


**Figura 46. Estudi ecocardiogràfic i anàlisi de rigidesa aòrtica.** **A)** Imatges representatives (mode M) de l'aorta ascendent d'un animal de cada grup experimental amb els valors dels diàmetres diastòlics (AoD) i sistòlics (AoS). **B)** Pulsatilitat de l'aorta ascendent (Ao-P, %). **C)** Correlació lineal entre la pressió del pols (PP, mmHg) i la pulsatilitat aòrtica (Ao-P, %). **D)** Mesura de rigidesa obtinguda a partir de l'Índex  $\beta$ . **E)** Mesura de rigidesa obtinguda a partir del *Elastic modulus* (Ep). SED n=16; MOD n=19; INT n=17. \*p<0.05, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001.

### 3.3.4. Remodelat estructural de la caròtida

L'anàlisi morfològic de la caròtida esquerra no va presentar diferències significatives en cap de les mesures estudiades (GTM, AL, GTM/DL i AST) entre els grups experimentals (Figura 47 A-D). Tanmateix, la quantificació del percentatge de col·lagen present en la túnica mitjana va mostrar un increment significatiu de fibrosi en la caròtida dels animals del grup INT en comparació amb els grups MOD i SED (Figura 47 F).

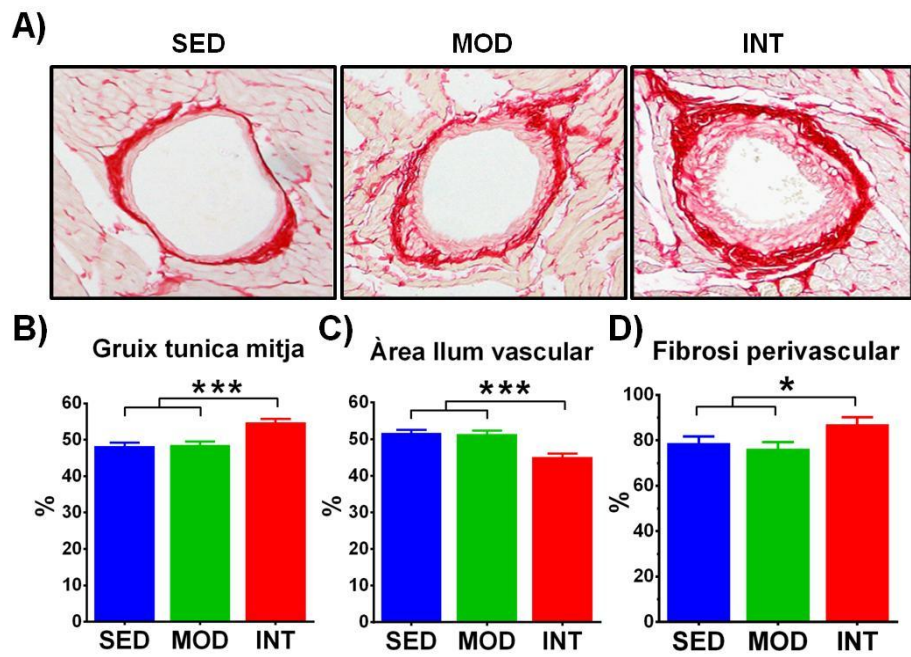




**Figura 47. Remodelat estructural de la caròtida esquerra induït per l'exercici físic.** **A)** Gruix ( $\mu\text{m}$ ) de la túnica mitja (GTM). **B)** Àrea ( $\mu\text{m}^2$ ) de la llum vascular (AL). **C)** Ràtio del gruix de la túnica mitja per la llum vascular (GTM/DL). **D)** Àrea ( $\mu\text{m}^2$ ) de la secció transversal de l'aorta (AST). SED n=4; MOD n=3; INT n=8. **E)** Imatges representatives de seccions histològiques de caròtida esquerra tenyides amb vermell de picrosirí (4X). **F)** Quantificació del percentatge de col·lagen de la túnica mitja (%). SED n=6; MOD n=3; INT n=9. Els valors corresponen a la mitjana $\pm$ EEM. p=ns (valor p no significatiu).

### 3.3.5. Remodelat estructural de vasos intramiocàrdics

Paral·lelament a una artèria elàstica de gran calibre com l'aorta, també es van investigar els possibles canvis estructurals produïts per diferents intensitats d'exercici sobre artèries musculars de petit calibre intramiocàrdiques. No es van trobar diferències estadísticament significatives entre els anàlisis del VD i el VE, pel que l'anàlisi final es va realitzar conjuntament. L'exercici d'alta intensitat va promoure un remodelat estructural en aquests vasos caracteritzat per un increment de l'àrea de la túnica mitja i una disminució de l'àrea de la llum del vas respecte a l'àrea total del vas. Així mateix els vasos intramiocàrdics del grup INT presentaven un augment significatiu de l'àrea de fibrosi perivascular en comparació amb els grups MOD i SED, tal i com es pot observar en la figura 48.



**Figura 48. Estudi morfomètric de vasos intramiocàrdics.** **A)** Imatges representatives de vasos intramiocàrdics de seccions transversals de ventricle tenyides amb vermell de picrosirius. **B)** Percentatge de l'àrea de la túnica mitja respecte a l'àrea total del vas (%). **C)** Percentatge de l'àrea de la llum vascular respecte a l'àrea total del vas (%). **D)** Percentatge de l'àrea fibrosi perivascular respecte a l'àrea total del vas (%). SED n=9; MOD n=9; INT n=9. Mitjana±EEM, \*p<0.05,\*\*\*p>0.0001.

### 3.4. CONCLUSIONS

Globalment, els resultats obtinguts d'aquest estudi mostren un efecte diferencial sobre el remodelat vascular associat a la dosi d'exercici, amb conseqüències adverses associades a dosis d'exercici molt elevades.

Per una banda l'exercici moderat promou una millora de les propietats elàstiques de l'aorta i no té cap efecte sobre el remodelat de l'artèria caròtida ni dels vasos intramiocàrdics en rates sanes. Per altra banda, l'exercici d'alta intensitat indueix un remodelat patològic de l'aorta tant a nivell estructural (increment de fibrosi i del número de ruptures de les làmines elàstiques de la túnica media) com funcional (PP elevada, índex de pulsatilitat inferior i índexs de rigidesa  $\beta$  i  $E_p$  augmentats). A més, l'exercici intens també promou un remodelat estructural patològic de l'artèria caròtida (increment de fibrosi de la túnica media) i de vasos intramiocàrdics (increment de fibrosi perivascular, augment del gruix de paret i disminució de la llum vascular).

L'augment de l'estrès oxidatiu de l'aorta determinat per la producció d'anió superòxid, una major activació del sistema RAA i una expressió diferencial de miRNAs a l'aorta podrien modular els canvis tant estructurals com funcionals induïts per l'exercici intens.

## **4. SUB-ESTUDI 1.2:**

Estudi del remodelat vascular  
associat a la síndrome de l'apnea del son



#### **4.1. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS**

##### Hipòtesi de treball

La SAOS indueix un remodelat vascular de l'aorta, incrementant el risc de desenvolupar malaltia ateroscleròtica. L'administració de CMMs pot prevenir el remodelat vascular de l'aorta induït per la SAOS.

##### Objectiu

Els objectius d'aquest estudi són:

- Descriure el remodelat vascular de l'aorta en un model de SAOS crònic en rata.
- Analitzar els mecanismes potencialment implicats en el remodelat vascular induït per la SAOS.
- Examinar l'efecte de l'administració de CMMs derivades de medul·la òssia en la prevenció del remodelat vascular induït per la SAOS.

## 4.2. METODOLOGIA

### 4.2.1. Model experimental

Aquest estudi es va realitzar d'acord amb les normes reguladores de la Unió Europea per l'ús d'animals d'experimentació (Directiva 86/609/EEC i 2010/63/UE) i va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

Per a aquest estudi es va utilitzar un model en rata amb l'objectiu d'estudiar la SAOS crònica. Aquest model animal prèviament validat <sup>372</sup>, va ser dissenyat per la Unitat de Biofísica i Bioenginyeria de la Facultat de Medicina (Universitat de Barcelona-IDIBAPS). Es tracta d'un model no invasiu, on es manté la rata desperta però immobilitzada dins d'un dispositiu tancat, que permet aplicar un patró repetitiu d'obstruccions de les vies aèries simulant les mateixes que pateixen els pacients amb SAOS severa (IAH≈60/h).

El sistema consisteix en un cilindre format per dos compartiments on se situa el cos de l'animal i el seu cap, separats entre ells per un collaret de làtex (Figura 49). El cilindre de plàstic transparent de 6.5 cm de diàmetre conté forats en tota la seva superfície que permeten la circulació de l'aire i mantenen la temperatura i humitat al seu interior. La base posterior del cilindre consisteix en una peça ajustable que permet restringir el moviment de l'animal en funció de la seva mida amb un orifici adaptat per la cua. El compartiment del cap té forma cònica per tal de reduir el volum d'aire quan la rata es troba correctament situada al seu interior. El collaret de làtex permet eliminar qualsevol fuga d'aire entre els dos compartiments, assegurant que la pressió no sigui excessiva per a l'animal. La rata respira a través d'un orifici situat al vèrtex del compartiment cònic. En aquesta posició hi ha una vàlvula que permet restringir el pas de l'aire a dins del compartiment i que està controlada de forma electrònica per tal de produir obstruccions aèries simulant les que caracteritzen la SAOS, amb increments dels esforços respiratoris, desaturacions d'oxigen i hipercàpnia intermitent.

Per tal d'assegurar el correcte funcionament del sistema, es va incorporar un transductor (Honeywell 176 PC; Microswitch, Boston, MA, EEUU) al compartiment cònic del cap per mesurar la pressió de forma continuada. La concentració de CO<sub>2</sub> de l'aire del compartiment cònic es va mesurar intermitentment (Tonometrics, Datex Engstrom, Helsinki, Finlàndia). També es van prendre mesures periòdiques de la SpO<sub>2</sub> mitjançant un pulsòmetre adaptable a la cua dels animals (Criticare Systems, Inc, Waukesha, WI, EEUU). Aquests paràmetres van ser controlats durant tot l'experiment per un investigador experimentat que certificava la presència d'apnees.

A l'inici de l'experiment un total de 30 rates mascle Sprague-Dawley de 250-300 g i 8 setmanes es van separar aleatòriament en dos grups: un grup Sham (n=14) i un grup SAOS (n=16). Tots els animals es van sotmetre a un període d'adaptació progressiu al sistema durant una setmana durant el qual les rates conscients es van col·locar dins del compartiment (sense l'aplicació d'obstruccions d'aire), incrementant la seva estada des de 1 hora al dia fins a arribar a les 6 h al dia. Les rates del grup SAOS van ser sotmeses a obstruccions aèries de 15 segons (assolint una SaO<sub>2</sub> del 80%) a una freqüència de 60 apnees per hora durant 6 hores al dia fins a un total de 21 dies consecutius. Les rates Sham es van col·locar dins del compartiment durant el mateix període de temps (6 h/dia durant 21 dies) però no se'ls va aplicar cap obstrucció aèria. Tots els animals van ser establats en un ambient controlat amb cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor, amb accés a aigua i menjar *ad libitum*, i es van supervisar diàriament per controlar l'estat de salut general i la possible aparició de signes d'estrès.

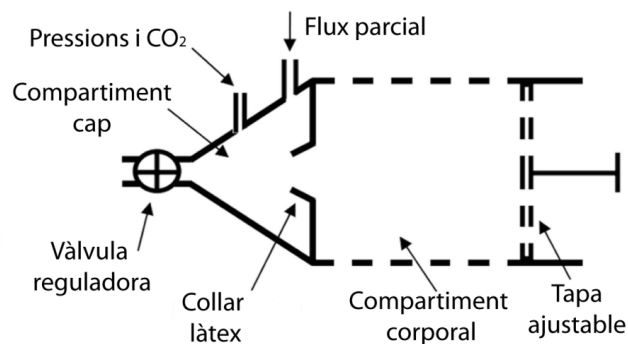


Figura 49. Esquema del sistema dissenyat per a l'aplicació del model animal d'obstruccions aèries en rata.

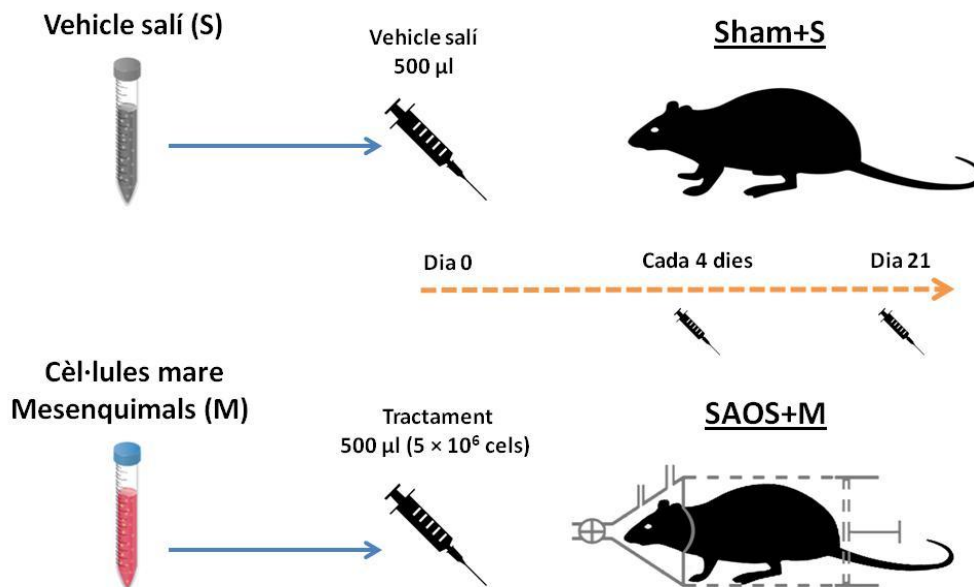
#### 4.2.2. Infusió de cèl·lules mare mesenquimals

Amb l'objectiu d'avaluar l'efecte de les CMMs derivades de medul·la òssia sobre el remodelat vascular induït per la SAOS crònica, 8 rates SAOS (que segueixen el protocol anterior) van rebre infusions de CMMs (SAOS+M). Per altra banda, 7 rates Sham van rebre infusions amb vehicle salí (Sham+S) i van servir com a grup control.

Les CMMs, prèviament caracteritzades, es van obtenir a partir del cultiu de cèl·lules de l'estroma de la medul·la òssia de rates Lewis cedides pel *Tulane Center for Gene Therapy* (Nova Orleans, LA, EEUU). Les cèl·lules es van cultivar amb medi MEM-alfa amb glutamina i sense ribonucleòsids o desoxirribonucleòsids (GIBCO, Gaithersburg, MD, EEUU) suplementat amb 20% de sèrum fetal boví (HyClone Cell Culture, Cultek, Madrid, Spain), 1% d'antibiòtics-antimicòtics (10,000 U/ml de Penicilina G sòdica, 10,000



µg/ml d'Amfotericina B (Fungizona, GIBCO) i 2% de L-glutamina (GIBCO). Les cèl·lules es van deixar créixer a 37°C, amb 5% de CO<sub>2</sub> i 100% d'humitat. Quan estaven subconfluents, es van dissociar amb tripsina (0.25%) i 1 mM d'àcid etildiaminotetraacètic (EDTA) en una solució salina de Hank's (HBSS, GIBCO) i van ser subcultivades a baixa densitat en flascons de cultiu nous. Per la preparació de la injecció, les CMMs es van dissociar de nou i es va preparar una suspensió a una concentració de  $5 \times 10^6$  cèl·lules en un volum final de 500 µl de tampó fosfat salí (PBS, GIBCO). La preparació es va administrar lentament durant 30 segons a través de la vena dorsal superficial del penis de les rates el primer dia abans de començar les apnees i cada 4 dies després de la primera injecció. Abans i durant la injecció, els animals es van anestesià amb isoflurà inhalat (2%). Cap dels animals va mostrar signes d'estrès al llarg de l'experiment ni possibles efectes secundaris derivats de la injecció de CMMs. A més, no es va haver d'excloure cap animal de l'estudi (Figura 50).



**Figura 50. Disseny experimental per avaluar l'efecte de la infusió de CMMs en el model de SAOS.** Un grup de rates es van distribuir aleatoriament en 2 grups: SAOS+M (n=8), van rebre infusions de 500 µl de CMMs ( $5 \times 10^6$  cèl·lules) i van ser sotmeses al model crònic de SAOS. Les infusions es van realitzar cada 4 dies fins al final del procotol (21 dies); Sham+S (n=7), van rebre infusions de vehicle salí cada 4 dies fins als 21 dies.

#### 4.2.3. Eutanàsia i recollida de mostres

Els animals es van anestesià amb uretà 10% (1g/kg) i a continuació, es va procedir a l'exanguinació mitjançant canulació de l'artèria caròtida. L'aorta toràcica descendent es va guardar immersa en OCT i congelada a -80°C per als posteriors anàlisis d'histologia o bé

es va congelar en nitrogen líquid per l'anàlisi dels nivells de proteïna mitjançant *Western Blot*.

#### 4.2.4. Aïllament de proteïna i anàlisi mitjançant *Western Blot*

Es va realitzar l'extracció de proteïna a partir de teixit congelat d'aorta toràcica en els animals d'ambdós grups. L'aorta congelada es va submergir en una solució de lisi amb *RIPA buffer* (89901, Thermo-Fisher Scientific) i inhibidors de proteasa (HaltProtease Inhibitor, 1862209, Thermo-Fisher Scientific) i es va homogeneïtzar amb el polítró Omni TH homogenizer (Omni International Inc.). Després d'una hora en rotació a 4°C, les mostres es van centrifugar a 10.000g (4°C) durant 30 min i es va recollir la fase superior o sobrenedant. La concentració total de proteïna es va quantificar amb el mètode de Pierce BCA protein Assay method (23227, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies) relativa a una corba estàndar de BSA. Els extractes de proteïna (25 µg) es van separar segons el seu pes molecular en gels NuPage® 4-12% Bis-Tris Gels (NP0322, Invitrogen, Life Technologies) en condicions desnaturalitzants mitjançant electroforesi i es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa mitjançant el sistema iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen, Life Technologies). Seguidament les membranes es van bloquejar durant 1 hora amb la solució Blocking Buffer 1X (B6429, Sigma-Aldrich, MO, USA), i es van deixar incubar tota la nit a 4°C i agitació suau amb l'anticòs primari corresponent. L'endemà es va seguir el mateix protocol detallat al sub-estudi 1.1 (apartat 3.2.12) per rentar les membranes i per la incubació de l'anticòs secundari. Les imatges es van capturar amb l'equip LAS4000 imaging system (GE Healthcare, OH, EEUU).

Per a la normalització de càrrega, la mateixa membrana es va rentar amb aigua destil·lada (5 min), i es va incubar amb la solució d'*stripping* Restore Western Blot (21059, Thermo Scientific) durant 15 min en agitació suau. Aquesta solució permet eliminar dels anticossos primaris i secundaris sense alterar les proteïnes de la membrana. La membrana es va tornar a bloquejar durant 1 hora amb la solució Blocking Buffer 1X (B6429, Sigma-Aldrich) i a continuació, es va reincubar cada membrana amb l'anticòs primari mouse monoclonal anti-Smooth muscle actin (clone 1A4) (M0851, Dako Diagnostics SA., Denmark). L'endemà es va rentar la membrana i es va incubar durant 1 hora en la mateixa solució a temperatura ambient i agitació suau, amb l'anticòs secundari HRP-Rabbit anti-mouse (A9044, Sigma-Aldrich) dil·luid 1/10000 en PBS amb 1% de Tween-20.

La banda de les proteïnes d'interès es va quantificar mitjançant anàlisi de densitometria amb el software ImageJ 1.48v software i es va normalitzar amb la banda corresponent a la proteïna actina de múscul llis  $\alpha$  (42 KDa).

Es van quantificar proteïnes relacionades amb el procés de fibrosi, amb la funció endotelial, amb l'estrès oxidatiu i amb el SRAA, utilitzant els següents anticossos primaris: anticòs policlonal anti-Collagen Type I/III (234169, Merck Millipore, Germany), anticòs purificat mouse anti-eNOS/NOS Type III (610297, BD Biosciences), anticòs purificat goat policlonal anti-gp91-phox (C-15) (sc-5827, Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, USA), anticòs policlonal rabbit anti-p47-phox (H-195) (sc-14015, Santa Cruz Biotechnology Inc.) i anticòs policlonal rabbit anti-Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE-1, F949) (BS3485, Bioworld Technology, MN, USA).

### **4.2.5. Anàlisi morfomètric de l'aorta**

Es va realitzar una tinció d'Hematoxilina-Eosina de seccions histològiques d'OCT (4 µm). A partir de les imatges de l'aorta (40X), es van realitzar mesures del perímetre extern i intern del vas (C). Es van obtenir les mesures del gruix de la túnica media (GTM), de l'àrea de la secció transversal (AST), del diàmetre de la llum (DL), i de la ràtio del gruix respecte al diàmetre de la llum (GTM/DL), seguint les fòrmules explicades en el sub-estudi 1.1 (apartat 3.2.8). La túnica adventícia no es va incloure en l'anàlisi. Totes les mesures es van realitzar per el mateix investigador de forma cega.

### **4.2.6. Quantificació de la fibrosi aòrtica**

Es va realitzar una tinció de vermell de picrosirius<sup>373</sup> en talls d'OCT (4µm) d'aorta toràcica per tal de quantificar el col·lagen total present a la túnica media. El protocol seguit va ser el mateix al detallat al sub-estudi 1.1 (apartat 3.2.10). Es van obtenir 4 imatges de cada aorta de manera aleatòria (20X), utilitzant els mateixos ajustaments d'imatge per a totes les mostres, amb el microscopi Olympus BX41TF i la càmera DP73. Les imatges es van analitzar mitjançant un mètode semiautomàtic que permet quantificar l'àrea tenyida de color vermell d'una regió d'interès prèviament definida, en relació a l'àrea tissular prèviament seleccionada (percentatge de col·lagen total). La quantificació de fibrosi es va realitzar de manera cega pel mateix investigador. La túnica adventícia, així com la túnica íntima van ser excloses de l'anàlisi.

### **4.2.7. Detecció d'anió superòxid**

Es va utilitzar la tècnica del DHE per a la detecció de la producció de superòxid en anells aòrtics prèviament congelats amb medi OCT, seguint el protocol detallat en el sub-estudi 1.1 (apartat 3.2.11). Es va analitzar la colocalització de fluorescència vermella (DHE) amb la fluorescència blava (DAPI) mitjançant el software ImageJ 1.48v.

#### **4.2.8. Anàlisi estadístic**

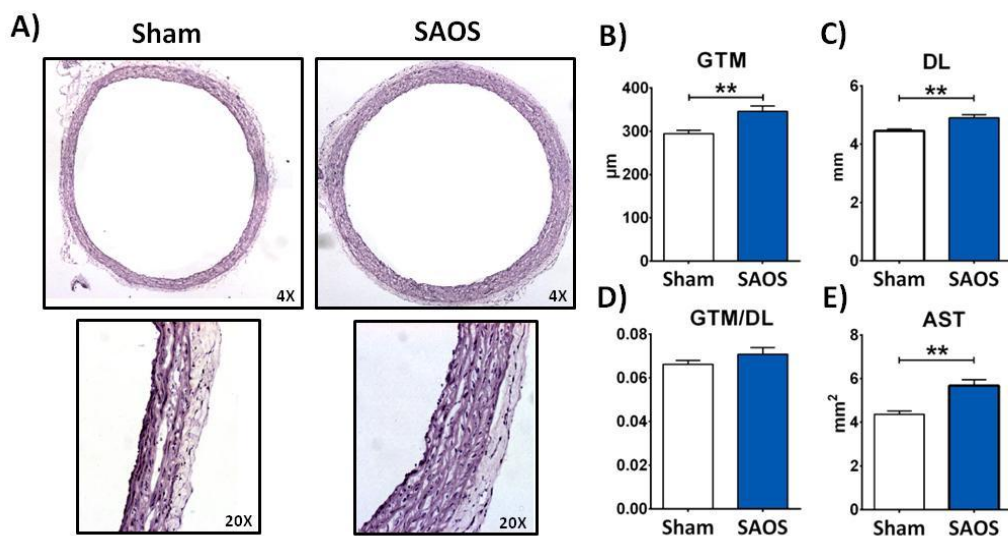
Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana (EEM). Les comparacions entre grups es van analitzar estadísticament amb el test paramètric de la *t Student* o bé amb el test no paramètric Mann-Whitney U, en els casos que les dades no seguissin una distribució normal. Un valor  $p < 0.05$  es va considerar estadísticament significatiu. L'anàlisi estadístic es va realitzar amb el software Prism 5 software (GraphPad Software).

### 4.3. RESULTATS

#### 4.3.1. Remodelat estructural de l'aorta induït pel SAOS

##### 4.3.1.1. Canvis morfomètrics de l'aorta

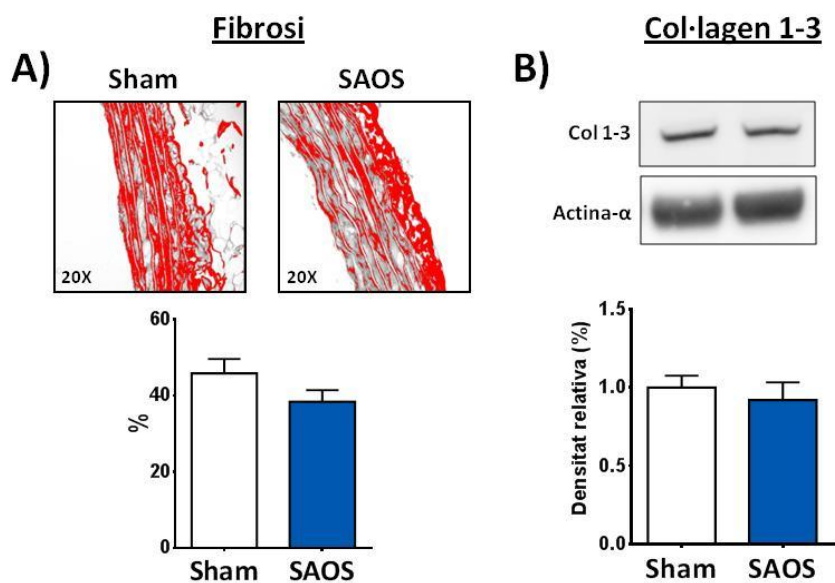
El gruix de la túnica mitjana de l'aorta es va trobar significativament incrementat en el grup SAOS, en comparació amb el grup Sham (Figura 51 B). A més, l'aorta de les rates del grup SAOS presentava un diàmetre de la llum del vas significativament més elevat en comparació amb les rates Sham (Figura 51 C).



**Figura 51. Remodelat morfològic de l'aorta induït pel SAOS.** A) Imatges representatives de tincions d'hematoxilina-eosina dels grups Sham (n=11) i SAOS (n=12). B) Gruix de la túnica mitjana (GTM), C) diàmetre de la llum (DL), D) ràtio del GTM i el DL, E) àrea de la secció transversal (AST). Resultats expressats com a mitjana ± EEM. \*\*p<0.01.

##### 4.3.1.2. Fibrosi aòrtica

La quantificació de fibrosi de la túnica mitjana de l'aorta mitjançant la tinció de vermell de picrosirius no va mostrar diferències significatives entre els grups Sham i SAOS. A més, els nivells de proteïna analitzats per *Western Blot* no es van trobar modificats per la SAOS (Figura 52).



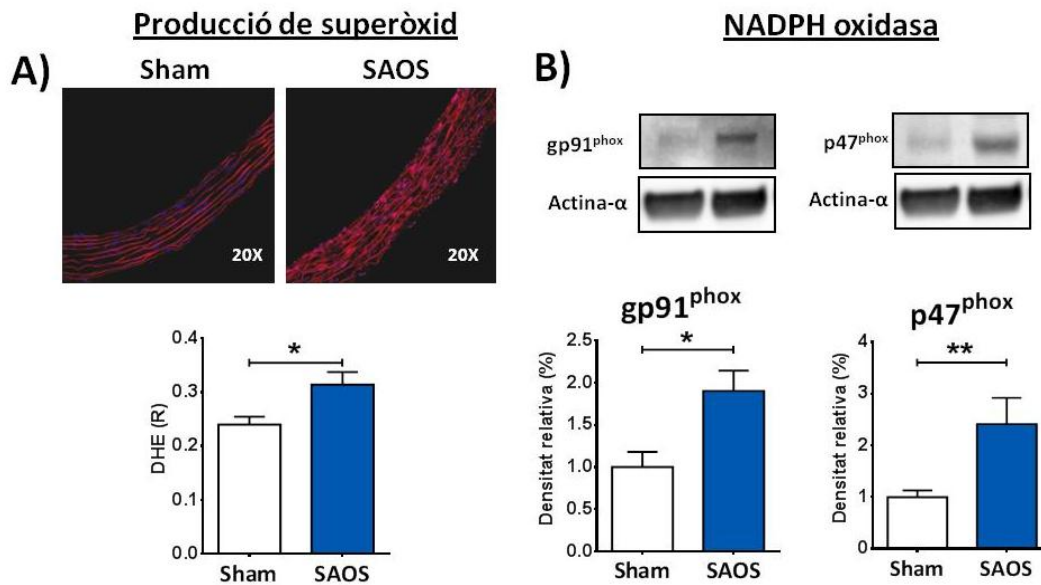
**Figura 52. Anàlisi de la fibrosi de l'aorta.** **A)** Imatges representatives de la tinció de vermell de picrosirius de talls d'OCT d'aorta de les rates Sham (n=11) i SAOS (n=15) i quantificació de la fibrosi de la túnica mitja (%). **B)** Immunoblots representatius de col·lagen 1-3 (panell superior) i actina α (panell inferior) i expressió relativa (%) del col·lagen 1-3. Resultats expressats com a mitjana ± EEM.

#### 4.3.2. Mecanismes de remodelat vascular induït per la SAOS

Es van analitzar els canvis en l'expressió de proteïnes clau en la producció de l'NO, de l'Ang-II i de l'estrès oxidatiu, com a possibles mecanismes moleculars implicats en el remodelat vascular induït per la SAOS.

##### 4.3.2.1. Nivells d'estrès oxidatiu

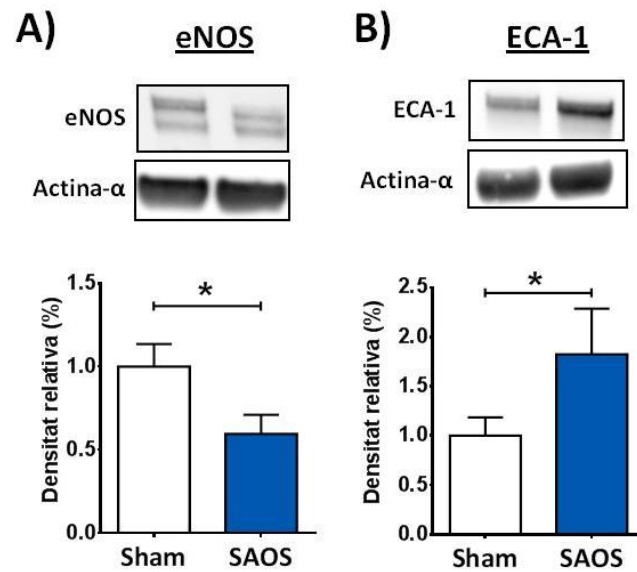
La quantificació de la fluorescència a la túnica mitja mitjançant DHE es va trobar incrementada en el grup SAOS en comparació amb el grup Sham, suggerint una major producció de superòxid induïda pel SAOS (Figura 53). Per altra banda, els nivells de proteïna de les subunitats gp91 and p47<sup>phox</sup> de la oxidasa NADPH, es van trobar incrementats en el grup SAOS.



**Figura 53. Producció de superòxid a l'aorta associada al SAOS.** **A)** Imatges representatives de fluorescència (20X) de DHE (vermell) i nuclis (blau) en talls d'OCT, i quantificació del DHE (R) de les rates Sham (n=12) i rates SAOS (n=15). **B)** Immunoblots representatius de gp91<sup>phox</sup> i p47<sup>phox</sup> (panells superiors) i actina-α (panells inferiors) i expressió relativa (%) de gp91<sup>phox</sup> i p47<sup>phox</sup>. Resultats expressats com a mitjana ± EEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

#### 4.3.2.2. Anàlisi dels nivells de proteïna d'eNOS i ECA-1

Els resultats de Western Blot van mostrar una disminució dels nivells de proteïna eNOS a l'aorta de les rates SAOS en comparació amb les rates Sham. La proteïna ECA-1 es va trobar sobreexpressada en el grup SAOS comparat amb el grup Sham (Figura 54).



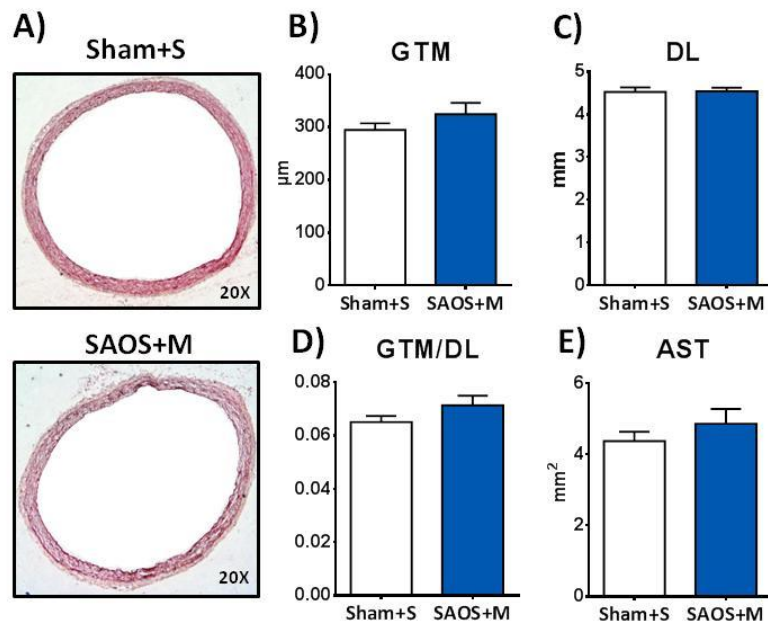
**Figura 54. Avaluació de marcadors de remodelat vascular a l'aorta. A)** Immunoblots representatius de la sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOS) (panell superior) i actina- $\alpha$  (panells inferiors) i quantificació de l'expressió relativa (%). **B)** Immunoblots representatius de la l'enzim convertidor d'angiotensina (ECA) (panell superior) i actina- $\alpha$  (panells inferiors) i quantificació de l'expressió relativa (%). Sham (n=7), SAOS (n=5). Resultats expressats com a mitjana  $\pm$  EEM. \*p<0.05.

### 4.3.3. Efecte de la infusió de cèl·lules mare mesenquimals

#### 4.3.3.1. Canvis morfològics de l'aorta

L'anàlisi dels canvis morfològics de l'aorta en seccions tenyides amb hematoxilina-eosina no va mostrar diferències entre els grups Sham+S i SAOS+M en cap dels paràmetres estudiats (Figura 55).

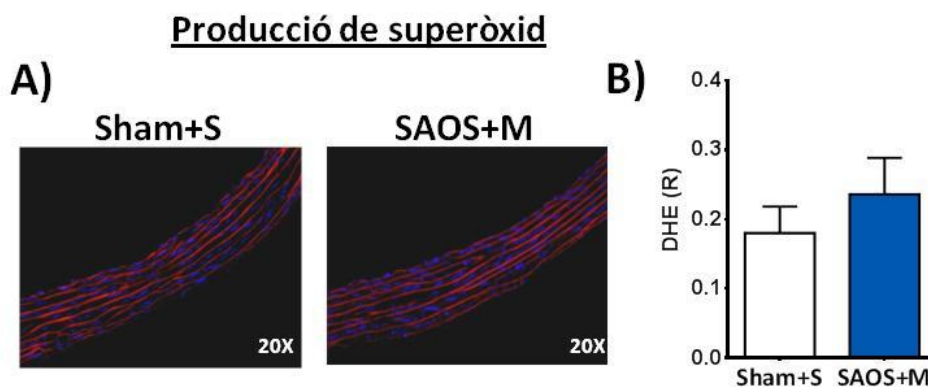




**Figura 55. Les cèl·lules mare mesenquimals normalitzen la dilatació aòrtica induïda pel SAOS. A)** Imatges representatives de seccions d'aorta tenyides amb hematoxilina-eosina de les rates Sham+S (n=6) i SAOS+M (n=5). **B)** Gruix de la túnica mitja (GTM), **(C)** diàmetre de la llum (DL), **(D)** ràtio entre el GTM i el DL, **(E)** àrea de la secció transversal (AST). Resultats expressats com a mitjana  $\pm$  EEM.

#### 4.3.4.2. Producció de superòxid

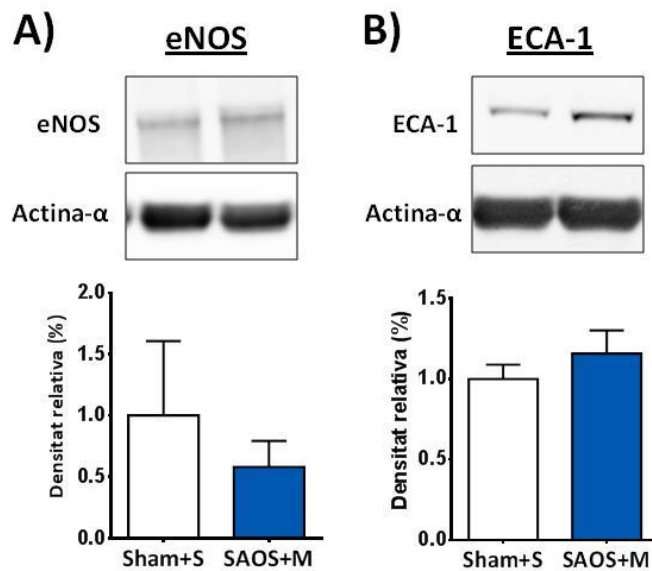
La quantificació de la producció de superòxid a l'aorta mitjançant DHE va ser similar entre els grups Sham+S i el SAOS+M, suggerint una prevenció de l'increment de l'estrès oxidatiu induït per la SAOS (Figura 56 B).



**Figura 56. Les cèl·lules mare mesenquimals atenuen la producció de superòxid induïda pel SAOS. A)** Imatges de fluorescència representatives (20X) de DHE (vermell) i nuclis (blau) en seccions d'OCT. **B)** Quantificació de superòxid mitjançant DHE (R) dels animals Sham+S (n=7) i SAOS+M (n=8).

#### 4.3.4.3. Anàlisi dels nivells de proteïna d'eNOS i ECA-1

Per d'analitzar els possibles efectes beneficis de la infusió de CMMs, es van estudiar els sistemes principals que contribueixen al remodelat vascular (NO i RAAS). L'anàlisi per *Western Blot* no va mostrar diferències entre els nivells de proteïna eNOS i ECA-1 entre els grups Sham+S i SAOS+M (Figura 57).



**Figura 57. Les cèl·lules mare mesenquimals atenuen els nivells de marcadors de remodelat vascular a l'aorta. A)** Immunoblots representatius de la sintasa d'òxid nítric (eNOS) (panell superior) i de l'actina- $\alpha$  (panell inferior) i quantificació de l'expressió relativa (%). **B)** Immunoblots representatius de l'enzim convertidor d'angiotensina 1 (ECA-1) (panell superior) i de l'actina- $\alpha$  (panell inferior) i quantificació de l'expressió relativa (%). Sham+S (n=8), SAOS+M (n=8).

#### **4.4. CONCLUSIONS**

Els resultats en el nostre model animal de SAOS confirmen la presència de remodelat vascular patològic a l'aorta caracteritzat per un engruiximent de la paret i dilatació de la llum vascular. Els resultats suggereixen la participació de mecanismes biològics com un augment de l'estrès oxidatiu (generació de superòxid) associat a un increment dels nivells de proteïna gp91 i p47<sup>phox</sup> i una disminució d'eNOS, així com una major activació del SRAA (increment de la proteïna ECA-1).

La infusió de CMMs com a tractament per a prevenir el remodelat vascular ha aconseguit ser beneficiós, disminuint els nivells de producció de superòxid, normalitzant els canvis morfomètrics induïts pel SAOS i atenuant els nivells de marcadors de remodelat patològic de l'aorta.

## **ESTUDI 2:**

### ESTUDI DEL REMODELAT CARDÍAC



## **5. SUB-ESTUDI 2.1:**

Estudi del remodelat profibròtic auricular  
associat a l'exercici físic intens i  
prevenció amb el sildenafil



## 5.1. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

### Hipòtesi de treball

L'exercici físic de resistència intens i mantingut, indueix un substrat arritmogènic especialment marcat en les cavitats dretes del cor. La sobrecàrrega de volum durant l'exercici i secundàriament, l'increment de la pressió pulmonar, contribueixen al desenvolupament del substrat arritmogènic auricular. La reducció de la pressió pulmonar durant l'exercici amb el sildenafil així com un efecte directe protector sobre el miocardi, és capaç de prevenir l'aparició de remodelat patològic cardíac.

### Objectiu

En aquest estudi es vol examinar l'efecte d'un inhibidor de la PDE5, el sildenafil, en la prevenció de remodelat cardíac patològic associat a l'exercici intens.

Els objectius específics d'aquest sub-estudi són:

- Avaluar la hipertròfia cardíaca induïda per l'exercici intens.
- Avaluar la fibrosi de les aurícules induïda per l'exercici intens.
- Examinar l'efecte del sildenafil en la prevenció de la hipertròfia cardíaca i de la fibrosi auricular induïdes per l'exercici intens.



## **5.2. METODOLOGIA**

### **5.2.1. Model animal**

Aquest estudi es va realitzar d'acord amb les normes reguladores de la Unió Europea per l'ús d'animals d'experimentació (Directiva 86/609/EEC i 2010/63/UE) i va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

Es van utilitzar rates mascles de la soca Wistar (Charles River Laboratories, France) amb un pes de 200-250g a l'inici de l'experiment. Tots els animals van ser estabulats en condicions controlades de temperatura 22-24°C i d'humitat relativa 60-65% amb cicles alternats de llum/fosc de 12 hores, i van tenir accés *ad libitum* a menjar i aigua.

### **5.2.2. Protocol d'entrenament**

Les rates van ser assignades de forma aleatòria en quatre grups diferents: grup sedentari (Sed), grup sedentari amb sildenafil (Sed+SIL), grup exercici (Ex), i grup exercici amb sildenafil (Ex+SIL). Les rates Ex i Ex-SIL es van sotmetre a un exercici de carrera continuada en cinta rodant (*Treadmill for animals*, Panlab, Barcelona, Spain). El protocol d'entrenament que van seguir els animals del grup exercici intens (Ex) i del grup exercici intens amb sildenafil (Ex+SIL), va ser exactament igual al protocol detallat al sub-estudi 1.1 (apartat 3.2.1) d'aquesta tesi.

### **5.2.3. Grups experimentals**

- Sed, n=10
  
- Sed+SIL, n=10
  
- Ex, n=10
  
- Ex+SIL, n=10

### **5.2.4. Administració del fàrmac**

Es va administrar sildenafil (NORMON, Espanya) als animals dels grups Sed+SIL i Ex+SIL a una dosi de 25 mg/kg/dia. La medicació va ser administrada mitjançant sonda oral diluïda en una solució salina (clorur sòdic 0.9%) en un volum final de 0,5 ml. El tractament es va administrar diàriament a la mateixa hora, 30 min abans de començar la sessió d'entrenament, i fins al final de l'estudi. Els animals dels grups Sed i Ex van ser

tractats seguint la mateixa pauta però se'ls hi va administrar solució salina (o vehicle) mitjançant sonda oral.

### **5.2.5. Eutanàsia i recollida de mostres**

Al llarg de l'estudi es van extreure mostres de sang una vegada al mes a través de la vena safena, que seguidament es van centrifugar 15 minuts a 2.000g i el plasma resultant es va congelar a -80°C. L'eutanàsia dels animals es va realitzar tres dies després de l'última sessió d'entrenament per tal d'evitar qualsevol resposta aguda a l'exercici mitjançant una sobredosi d'isoflurà (>5%) i es va confirmar per exsanguinació. Els cors van ser extrets ràpidament, netejats, pesats i fixats en formaldehid al 4% per a la posterior inclusió en parafina per l'estudi histològic o bé es van congelar en nitrogen líquid disseccionant les quatre cavitats (AD, AE, VD i VE) pels estudis de biologia molecular. Al moment de l'eutanàsia, es van obtenir mostres de sang de tots els animals a través de la punció de la vena cava, de la que es va obtenir plasma que es va congelar a -80°C. Per a l'estudi histològic, el cor es va tallar sobre l'eix transversal a nivell mig abans de ser inclòit en parafina. Tots els blocs de parafina es van tallar en seccions de 4 µm amb un micròtom Leica RM2125RT (Leica microsystems, Wetzlar, Alemanya). Totes les imatges es va obtenir amb un microscopi òptic Olympus BX51 i càmera Olympus DP50 (Olympus Corporation). Les imatges es van analitzar amb el programa d'imatge analySIS® Image Processing software (Soft Imaging System GMBH, Alemanya).

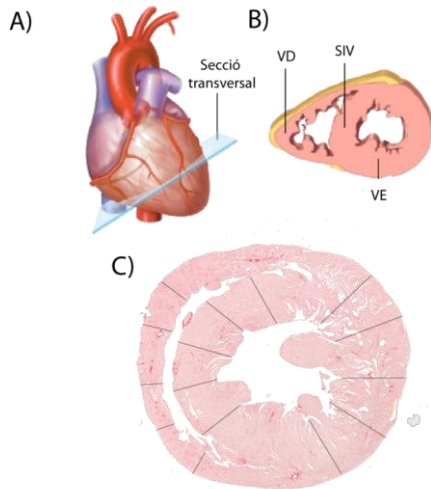
### **5.2.6. Assaig ELISA de GMPc**

L'objectiu d'aquest assaig va ser la detecció de la concentració de GMPc plasmàtic. Es va realitzar un assaig ELISA de GMP cíclic (581021, Cayman Chemical, MI, EEUU) amb mostres de plasma obtingudes a les 8 i a les 16 setmanes. El GMPc és un mediador intracel·lular que participa en la relaxació del múscul llis i s'incrementa amb la producció d'NO. L'increment del GMPc plasmàtic per tant, és una mesura indirecta de l'efecte sistèmic produït pel sildenafil.

### **5.2.7. Avaluació de la hipertròfia cardíaca**

La hipertròfia cardíaca es va analitzar mitjançant la determinació de la ràtio del pes del cor en relació al pes corporal de cada animal a les 16 setmanes (Ràtio Hipertròfia = [Pes Cor (g) / Pes rata (kg)]). També es van quantificar els gruixos de les parets lliures del ventricle dret (VD), ventricle esquerre (VE) i septe interventricular (SIV) en talls transversals de cor tenyits amb Hematoxilina-Eosina. Els talls es van obtenir a nivell mig del cor, per sota de les cavitats auriculars.

A partir de fotografies (40X) de seccions de cor a nivell mig (Figura 58 A) de cada animal, es van obtenir 5 mesures de la distància ( $\mu\text{m}$ ) continguda entre el sub-endocardi i el sub-epicardi de cada una de les parets ventriculars (VD, SIV i VE) (Figura 58 B), exclouent les trabècules i els músculs papil·lars. Es va obtenir la mitjana dels tots els valors i es va normalitzar pel pes corporal dels animals (g).



**Figura 58. Esquema de les seccions de cor analitzades. A)** Esquema representatiu del cor i de la secció transversal obtinguda per l'anàlisi de l'hipertrofia ventricular. **B)** Esquema de la secció transversal a nivell mig ventricular. **C)** Secció histològica de cor. Les línies corresponen a les zones on s'han pres les mesures dels gruixos de les parets lliures dels ventricles: VD (ventriculo dret), SIV (septe interventricular) i VE (ventriculo esquerre).

### 5.2.8. Quantificació de la fibrosi auricular

Per tal de quantificar la fibrosi intersticial present a ambdues aurícules, es va realitzar una tinció de vermell de picosirius en talls histològics de parafina. Es va seguir el mateix protocol detallat al sub-estudi 1.1 (apartat 3.2.10) amb canvis menors. Es van realitzar talls seqüencials de  $4\mu\text{m}$  a partir d'una secció de cor a nivell basal, fins a localitzar la totalitat del teixit auricular amb l'ajuda d'un microscopi òptic. Es van avaluar de 4 a 6 imatges de cada aurícula (40X) mitjançant un mètode semiautomàtic que permet quantificar el percentatge de col·lagen intersticial (tenyit de color vermell) en relació a l'àrea tissular seleccionada. L'anàlisi morfomètric es va realitzar de manera cega pel mateix investigador. Les zones de fibrosi perivascular així com la fibrosi endocàrdica i pericàrdica van ser excloses de l'anàlisi.

### 5.2.9. Aïllament d'ARNm

El teixit miocàrdic auricular congelat (50 mg) es va homogeneïtzar amb un politró Omni Tissue Homogenizer TH (Omni International) amb el reactiu Trizol® (Invitrogen, Life Technologies). Després de separar la fase aquosa mitjançant centrifugació amb cloroform (C-2432, Sigma-Aldrich), l'ARN es va purificar mitjançant columnes amb el kit RNA Aqueous (Ambion, Life Technologies) seguint les instruccions del fabricant. Seguidament, es va comprovar la integritat de l'ARN mitjançant l'observació de bandes corresponents a

l'ARN ribosomal (18S i 28S) en un gel desnaturalitzant d'agarosa amb formaldehid al 8%. Seguidament, es va mesurar la concentració de l'ARN mitjançant densitat òptica a 260 i 280 nm amb un espectrofotòmetre Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). La síntesi d'ADNc es va realitzar a partir de 1 µg de ARNm total amb el kit High capacity cDNA RT (4368814, Applied Biosystems, Life Technologies) afegint inhibidors d'ARNases (N8080119, Applied Biosystems, Life Technologies) en un termociclador MJ Research 200 (MJ Research, MA, USA). La reacció de RT es va realitzar seguint els següents passos: 10 min a 25°C, 2 h a 37°C i 5 min a 85°C. L'expressió d'ARNm de TGFβ-1 i ECA del teixit auricular es va quantificar mitjançant RT-PCR en un termociclador 7900HT Fast System (Applied Biosystems, Life Technologies). Es van utilitzar sondes Taqman específiques per gens únics (Taqman Gene Expression Assays: Rn00572010-m1, Rn00561094\_m1\*) i el TaqMan Universal PCR Master Mix with AmpErase UNG (Life Technologies). La sonda TaqMan® conté una seqüència específica per un gen i està dissenyada per unir-se a la seqüència d'interès just a la regió flanquejada entre els dos iniciadors o *primers*. A l'extrem 5' de la sonda s'hi troba unit un fluorocrom emissor o *reporter*. A l'extrem 3' s'hi troba unit un fluorocrom receptor o *quencher*, que anul·la l'emissió de fluorescència del *reporter*. Durant la fase d'extensió de la PCR, la sonda és hidrolitzada per l'activitat exonucleasa 5' de la Taq polimerasa, alliberant el *reporter* del *quencher* i permetent l'emissió de fluorescència. Així doncs, la fluorescència quantificada és proporcional al número de còpies de l'ADNc diana present a la mostra.

Els resultats es van analitzar segons el mètode de quantificació relativa a una corba estàndard de concentració coneguda. La corba estàndard es va generar a partir d'una mostra de concentració coneguda, de la qual es van fer dilucions seqüencials de diferent ordre de magnitud. Es va utilitzar sempre la mateixa corba estàndard en cada reacció de PCR realitzada. Els resultats es van expressar en ng equivalents d'ADNc (ng-equ) relatius a la corba estàndard.

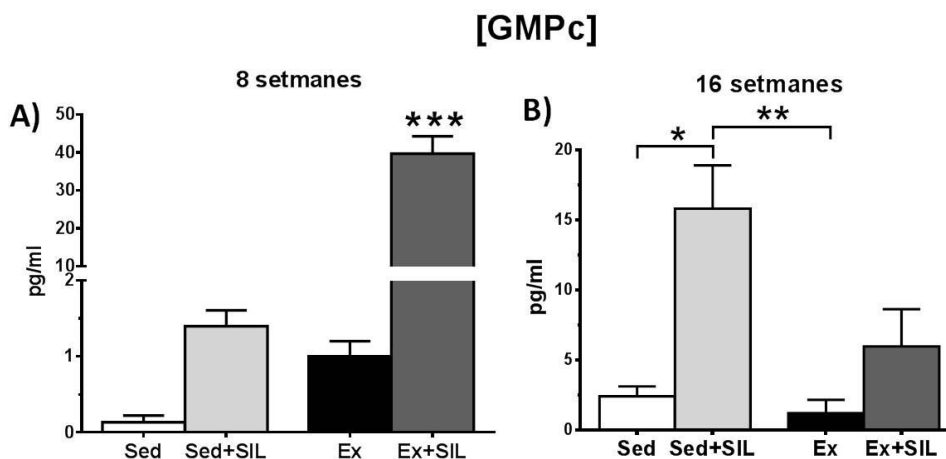
#### 5.2.10. Anàlisi estadístic

Totes les variables analitzades van demostrar seguir una distribució normal analitzada amb el test de Shapiro-Wilks i van ser expressades com la mitjana ± l'error estàndard de la mitjana (EEM). Es va utilitzar el test de Grubbs per excloure els *outliers* extrems (un màxim d'un per grup). La majoria de comparacions es van realitzar amb un anàlisi de variància ANOVA de dos factors, amb anàlisis post-hoc amb LSD en presència d'un omnibus significatiu. Les comparacions entre 2 grups es van realitzar utilitzant el test de la t d'*Student* de mostres no aparellades. Tots els càlculs estadístics es van dur a terme amb el programa SPSS v16.0 (SPSS Institute Inc, Cary, NC, EEUU). Un valor de p <0.05 es va considerar estadísticament significatiu.

### 5.3. RESULTATS

#### 5.3.1. Nivells de GMPc en plasma

Es va fer una assaig ELISA en el plasma obtingut a les 8 i a les 16 setmanes per detectar els nivells de GMPc. Tal i com s'observa en la figura 60 A, a les 8 setmanes, els grups tractats (Sed+SIL i Ex+SIL) presentaven una elevació en la concentració de GMPc plasmàtica respecte als grups no tractats (Sed i Ex). Aquesta elevació va ser significativament superior en el grup Ex+SIL en comparació amb la resta de grups. A les 16 setmanes, la concentració plasmàtica de GMPc del grup Sed+SIL es va trobar incrementada respecte a les 8 setmanes ( $1.4 \pm 0.2$  pg/ml vs.  $15.8 \pm 3.1$  pg/ml) i va resultar ser significativament més elevada en comparació amb els grups no tractats (Figura 59). Per altra banda, la concentració de GMPc plasmàtica del grup Ex+SIL a les 16 setmanes, tot i mantenir-se elevada respecte al grup Ex, es va trobar disminuïda respecte a les 8 setmanes ( $39.7 \pm 4.6$  pg/ml vs.  $5.9 \pm 2.7$  pg/ml).



**Figura 59. Quantificació de la concentració de GMPc amb ELISA. A)** Concentració plasmàtica de GMP cíclic en plasma a les 8 setmanes. **A)** Concentració plasmàtica de GMP cíclic en plasma a les 16 setmanes. Sed: Sedentari; Sed+SIL: Sedentari+sildenafil; Ex: Exercici, Ex+SIL: Exercici+sildenafil. N=3 rates/grup. Mitjana±EEM, \*p<0.05; \*\*p<0.001; \*\*\*p<0.0001.

#### 5.3.2. Hipertrofia cardíaca

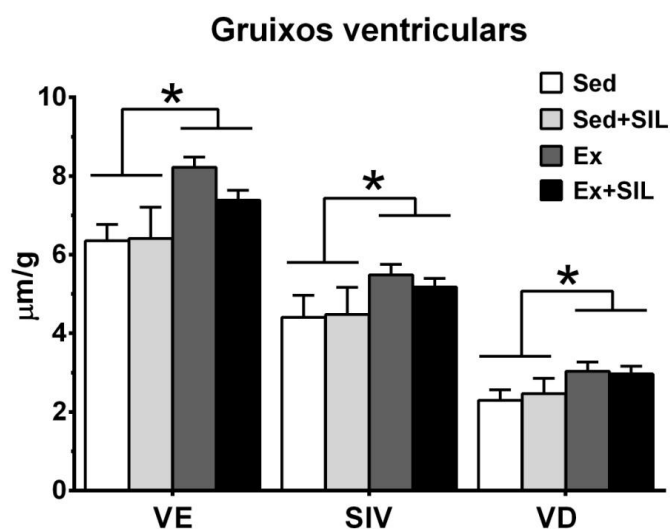
L'exercici físic intens va associar-se a un menor guany de pes a les 16 setmanes en els grups Ex i Ex+SIL respecte als grups Sed i Sed+SIL. Per altra banda, el pes del cor no va mostrar cap diferència significativa entre els grups experimentals a les 16 setmanes (Taula 4). Tanmateix, la ràtio del pes del cor en relació al pes de cada animal (hipertrofia) va ser més elevada en els grups exercici (Ex i Ex+SIL) en comparació amb els grups sedentaris (Sed i Sed+SIL). El tractament amb sildenafil no va modificar aquests

paràmetres en cap dels grups analitzats. La taula 4 mostra els valors del pes dels animals, així com del pes del cor i de la ràtio pes del cor entre pes de l'animal obtinguts a les 16 setmanes.

**Taula 4. Pes dels animals (g), pes del cor (g) i ràtio del pes de cor normalitzat pel pes corporal a les 16 setmanes.** Sed: Sedentari; Sed+SIL: Sedentari+sildenafil; Ex: Exercici, Ex+SIL: Exercici+sildenafil. N=10 rates/grup. Mitjana±EEM, \*p<0.05 vs. Sed, #p<0.05 vs. Sed+SIL.

	Pes corporal (g)	Pes cor (g)	Pes cor (g)/pes corporal (kg)
<b>Sed</b>	430.9±10.93	1.006±0.0323	2.34±0.05
<b>Sed+SIL</b>	439.4±15.69	1.037±0.031	2.37±0.04
<b>Ex</b>	373.3±7.79 *#	0.999±0.022	2.68±0.07 *#
<b>Ex+SIL</b>	384.5±7.98 *#	1.032±0.024	2.69±0.06 *#

Els resultats de mesures directes dels gruixos de les parets lliures dels ventricles van mostrar increments significatius dels gruixos del VE, del VD i del septe interventricular normalitzats pel pes corporal en els grups exercici (Ex i Ex+SIL) en comparació amb els grups sedentaris (Sed i Sed+SIL) (Figura 60). El sildenafil no va tenir cap efecte sobre aquestes mesures (Figura 60).

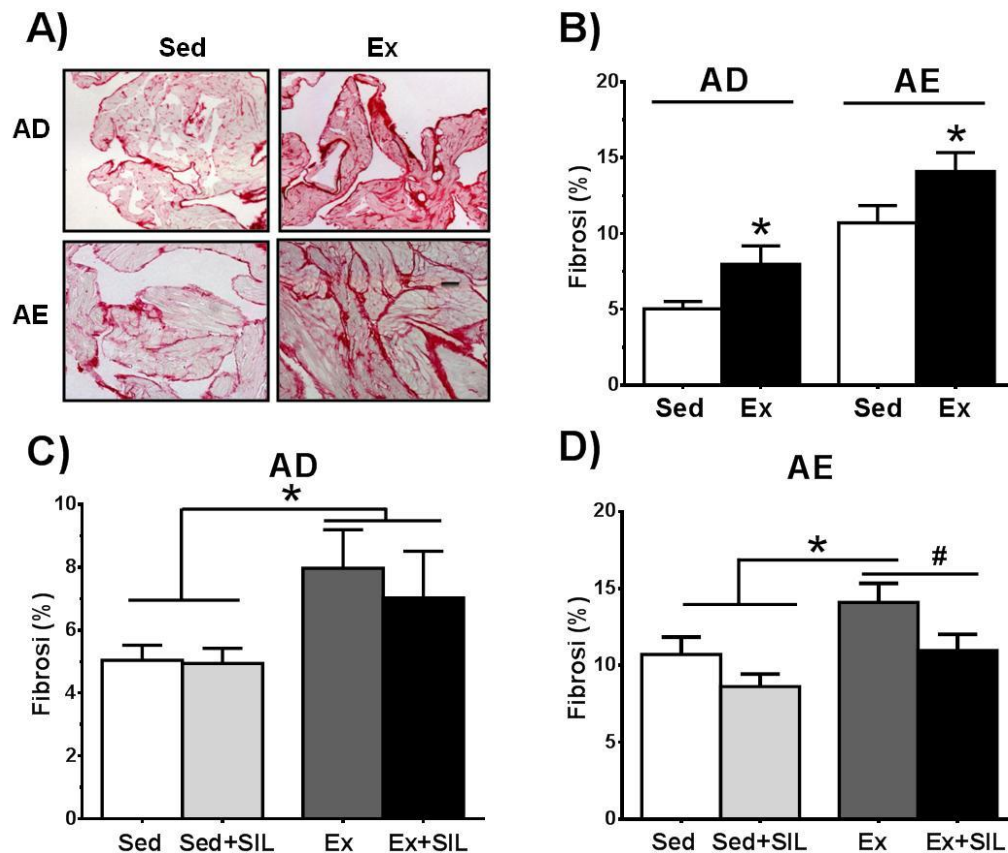


**Figura 60. Avaluació de la hipertròfia ventricular.** VE: Ventricle esquerre; SIV: Septe interventricular; VD: Ventricle dret. Sed (n=6); Sed+SIL (n=9); Ex (n=5); Ex+SIL (n=8). \*p<0.05 Sed vs. Ex.

### 5.3.3. Fibrosi auricular

Tal i com es pot observar en la figura 61, l'exercici intens va provocar un increment significatiu del percentatge de col·lagen en ambdues aurícules en comparació amb el grup Sed (Figura 61 B). El grup Sed+SIL va presentar els mateixos nivells de fibrosi respecte al grup Sed, tant en l'AD com en l'AE. El grup Ex+SIL no va mostrar diferències en els nivells de fibrosi de l'AE respecte als grups Sed i Sed+SIL, indicant un efecte

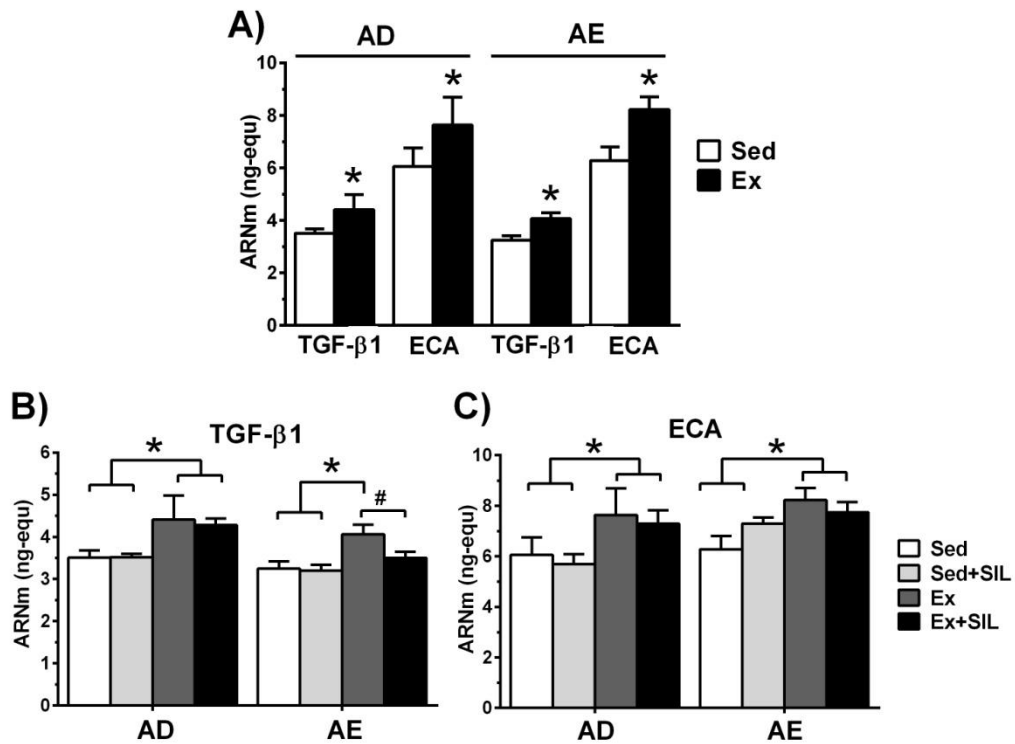
positiu del sildenafil en la prevenció del remodelat profibròtic en l'AE (Figura 61 C). D'altra banda, el tractament amb sildenafil no va modificar els nivells de fibrosi de l'AD (Figura 61 D).



**Figura 61. Quantificació de la fibrosi auricular.** A) Fotografies representatives (40X) de seccions histològiques tenyides amb vermell de picosirius d'aurícula dreta (AD) i d'aurícula esquerra (AE) dels grups sedentari (Sed) i exercici (Ex). B) Quantificació del percentatge de col·lagen en l'AD i l'AE dels grups Sed (n=9) i Ex (n=8). C) Quantificació del percentatge de col·lagen en l'AD dels grups Sed (n=9), Sed+SIL (n=10), Ex (n=9) i Ex+SIL (n=9). D) Quantificació del percentatge de col·lagen en l'AE dels grups Sed (n=9), Sed+SIL (n=10), Ex (n=8) i Ex+SIL (n=8). \*p<0.05 Sed vs. Ex; #p<0.05 Ex vs. Ex+SIL.

### 5.3.4. Expressió d'ARNm de marcadors profibròtics

Es va quantificar l'expressió d'ARN missatger dels marcadors profibròtics TGF- $\beta$ 1 i d'ECA en les dues aurícules dels animals dels diferents grups experimentals. Tal i com s'observa en la figura 62 A, l'exercici intens va provocar un increment significatiu de l'expressió d'ARNm de TGF- $\beta$ 1 i d'ECA en comparació amb el grup sedentari. Amb el tractament amb sildenafil, els nivells d'expressió d'ECA a les aurícules no es van veure modificats (Figura 62 C). Tanmateix, l'expressió de TGF- $\beta$ 1 es va trobar significativament reduïda en l'AE del grup Ex+SIL en comparació amb el grup Ex, no presentant diferències amb els grups Sed i Sed+SIL (Figura 62 B). El sildenafil no va tenir cap efecte sobre l'expressió de TGF- $\beta$ 1 en l'AD.



**Figura 62. Expressió d'ARNm dels marcadors fibròtics TGF-β1 i ECA en ambdues aurícules. A)** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-eq) de TGF-β1 i ECA en l'aurícula dreta (AD) i en l'aurícula esquerra (AE) dels grup sedentari (Sed, n=9) i exercici (Ex, n=9). **B)** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-eq) de TGF-β1 en AD (Sed, n=10; Sed+SIL, n=10; Ex, n=9; Ex+SIL, n=9) i AE (Sed, n=9; Sed+SIL, n=10; Ex, n=9; Ex+SIL, n=9). **C)** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-eq) d'ECA en AD i AE en els mateixos grups que el gràfic B. \*p<0.05 Sed+SIL vs. Ex+SIL; #p<0.05 Ex vs. Ex+SIL.



#### **5.4. CONCLUSIONS**

Els resultats demostren que l'exercici de resistència intens i mantingut durant llargs períodes de temps promou la hipertròfia cardíaca i el remodelat miocàrdic amb l'aparició de fibrosi auricular.

L'administració de sildenafil a una dosi baixa (25 mg/kg/dia) no ha promogut cap canvi sobre la hipertròfia cardíaca induïda per l'exercici. D'altra banda, el sildenafil ha tingut un efecte protector sobre la fibrosi en l'AE, suggerint una possible acció directa i específica del sildenafil sobre el miocardi. El TGF- $\beta$  podria tenir un paper important en l'efecte antifibròtic del sildenafil. El paper protector del sildenafil en la reducció del remodelat de les cavitats dretes del cor a través de la disminució de la PAP no s'ha pogut demostrar en aquest estudi.

## **6. SUB-ESTUDI 2.2:**

Estudi del remodelat profibròtic auricular  
associat a la síndrome de l'apnea del son i  
prevenció amb cèl·lules mare mesenquimals



## 6.1. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

### Hipòtesi de treball

La SAOS indueix un remodelat patològic de les aurícules amb un increment de la fibrosi, creant un substrat per l'aparició de FA. L'administració de CMMs pot prevenir el remodelat auricular i l'aparició del substrat arritmogènic.

### Objectius

Els objectius d'aquest estudi són:

- Estudiar el desenvolupament del substrat arritmogènic que promou un major risc de FA en individus amb SAOS.
- Analitzar els mecanismes potencialment implicats en el remodelat auricular induït per la SAOS.
- Examinar l'efecte de l'administració de CMMs derivades de medul·la òssia en la prevenció del remodelat auricular induït per la SAOS.

## **6.2. METODOLOGIA**

### **6.2.1. Model experimental**

Aquest estudi es va realitzar d'acord amb les normes reguladores de la Unió Europea per l'ús d'animals d'experimentació (Directiva 86/609/EEC i 2010/63/UE) i va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

El model animal de SAOS que es van utilitzar va ser el mateix detallat al sub-estudi 1.2 (apartat 4.2.1) d'aquesta tesi.

### **6.2.2. Infusió de cèl·lules mare mesenquimals**

Amb l'objectiu d'avaluar l'efecte de les CMMs derivades de medul·la òssia sobre el remodelat estructural de les aurícules induït per la SAOS crònica, 8 rates SAOS van rebre infusions de CMMs (SAOS + CMM). D'altra banda, 7 rates Sham van rebre infusions amb vehicle salí (Sham + S) i van servir com a grup control.

El protocol d'obtenció de les CMMs i de l'administrament mitjançant injeccions periòdiques va ser el mateix detallat al sub-estudi 1.2 (apartat 4.2.2) d'aquesta tesi.

### **6.2.3. Grups experimentals**

- Sham, n=14
- SAOS, n=16
- Sham + vehicle salí (Sham+S), n=7
- SAOS + cèl·lules mare mesenquimals (SAOS+CMM), n=8

### **6.2.4. Recollida de mostres i aïllament d'ARN**

L'eutanàsia dels animals es va realitzar amb una injecció intraperitoneal amb uretà al 10% (1 g/kg) i es va procedir a una exsanguinació a través de la canulació de l'artèria caròtida. Es van recollir mostres de sang en tubs amb EDTA que es van centrifugar a 3000 rpm, durant 15 minuts i es va congelar a -80°C.

Sota els efectes de l'anestèsia profunda, el cor dels animals es va extreure ràpidament, es va netejar de sang, es va pesar i es van obtenir mostres de VE, VD, AE i AD. Les mostres es van congelar en nitrogen líquid per anàlisis posteriors de biologia molecular. Per l'estudi histològic, es va obtenir una secció transversal de cor a nivell mig ventricular i a nivell basal (incloent les dues cavitats auriculars), les quals es van fixar amb

formaldehid al 4% durant 24 hores i posteriorment van ser incloses en parafina. L'ARNm total es va aïllar de forma separada en les quatre cavitats cardíques i es va convertir en ADNc seguint el mateix protocol detallat al sub-estudi 2.1 (apartat 5.2.9).

### 6.2.5. Reacció de retrotranscripció i PCR a temps real

Es va quantificar l'expressió d'ARNm de gens implicats en l'activació de la síntesi de col·lagen (ECA, TGF-  $\beta$ 1), en la seva maduració i assemblatge (LOX), en la seva degradació (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2), així com gens relacionats amb l'estrès oxidatiu (eNOS) i la inflamació (IL-6) (Taula 5).

El protocol de RT usat va ser el mateix que el detallat al sub-estudi 2.1. (apartat 5.2.9). Un cop obtingut l'ADNc, es va procedir a detectar i analitzar la quantitat de producte amplificat per uns primers o sondes de gens únics mitjançant PCR-RT en un termociclador 7900HT Fast System. Es va utilitzar el TaqMan Universal PCR Master Mix with AmpErase UNG i sondes per a gens únics TaqMan® (Applied Biosystems, Life Technologies) com a mètode de detecció de la fluorescència del producte amplificat. Els resultats es van analitzar segons el mètode de quantificació relativa a una corba estàndard de concentració coneguda. Els resultats es van expressar en nanograms equivalents d'ADNc (ng-equ) relatius a la corba estàndard.

**Taula 5. Sondes TaqMan de gens únics utilitzades en la PCR-RT.**

Gens	Abreviació	Referència TaqMan
Enzim Convertidor de l'Angiotensina-1	ECA-1	Rn00561094_m1
Factor de Creixement Transformant- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 1	Rn00572010-m1
Lisil Oxidasa	LOX	Rn01491829_m1
Metal·loproteïnasa de Matriu-2	MMP-2	Rn01538170_m1
Metal·loproteïnasa de Matriu-3	MMP-3	Rn00591740_m1
Metal·loproteïnasa de Matriu-9	MMP-9	Rn00579162_m1
Metal·loproteïnasa de Matriu-10	MMP-10	Rn00591678_m1
Inhibidor Tissular de Metal·loproteïnasa-1	TIMP-1	Rn00587558-m1
Inhibidor Tissular de Metal·loproteïnasa-2	TIMP-2	Rn00573232_m1
Sintasa d'Òxid Nítric-3	NOS-3	Rn02132634_s1
Interleuquina-6	IL-6	Rn00563409_m1

### **6.2.6. Extracció de proteïna**

Es va extreure proteïna del teixit cardíac de les quatre cavitats de tots els grups experimentals. En primer lloc es va homogeneïtzar el teixit amb un polítró Omni Tissue Homogenizer TH (Omni International) en una solució freda de lisi que contenia: tampó RIPA (R0278, Sigma-Aldrich), 1 mM de fluorur de fenilmetilsulfonil (P7626, Sigma-Aldrich), 1 mM de ortovanadat de sodi (S6508), 1 mM de Pefabloc (11429868001, Roche, Suïssa), i el còctel Complete Mini Protease Inhibitor (11836153001, Roche). Després d'una hora en rotació a 4°C, les mostres es van centrifugar a 10.000 g i es va recollir la fase superior o sobrenedant. La concentració de proteïna total es va quantificar amb el Pierce BCA protein Assay method (23227, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies). Les concentracions de proteïna es van obtenir amb el lector de plaques Multi Modal Synergy 2 (Biotek, Instruments Inc., VT, EEUU), relatives a una corba estàndard d'Albúmina Sèrica Bovina (BSA) realitzada a concentracions diferents.

### **6.2.7. Western Blot de MMP-2**

Un cop quantificada la concentració de proteïna de totes les mostres, es van carregar 40 µg de cada mostra en condicions reductores (2.5% de β-mercaptoetanol) i desnaturalitzants (NuPAGE® MES SDS running buffer, NP0002, Invitrogen, Life Technologies), en gels NuPage® 4-12% Bis-Tris Gels (NP0322, Invitrogen, Life Technologies). La tècnica de *Western Blot* aplicada vas ser la mateixa que la descrita al sub-estudi 1.1 (apartat 3.2.12), utilitzant l'anticòs primari MMP-2 (ab37150, Abcam, Cambridge, Regne Unit) diluït 1/500 i l'anticòs secundari HRP-Goat anti rabbit diluït 1/1000 (31460, Thermo Fisher Scientific).

Les bandes es van quantificar mitjançant anàlisi per densitometria amb el software ImageJ 1.48v. La càrrega de proteïna de cada carril es va normalitzar amb la banda de 40 kDa del mateix carril obtinguda amb la tinció de Ponceau S. Els resultats s'han expressat en unitats arbitràries (U.A.), obtingudes a partir de la divisió de les densitats normalitzades de cada mostra entre la densitat normalitzada d'una mostra estàndard present en cadascuna de les membranes.

### **6.2.8. Assaig en plasma ELISA**

Amb l'objectiu d'analitzar la inflamació sistèmica produïda per la SAOS, es van mesurar els nivells plasmàtics de la citocina pro-inflamatòria i pro-fibròtica Interleuquina 1-β (IL-1β) i de la citocina anti-inflamatòria Interleuquina-10 (IL-10), mitjançant assaigs immunoenzimàtics (ELISA) Quantikine (RLB00 i R1000, R&D Systems, MN, EEUU). L'ELISA és una tècnica immunològica que permet detectar un antigen mitjançant un

anticòs immobilitzat enllaçat a un enzim que genera un producte que es pot mesurar per colorimetria, un cop afegit el substrat adequat. L'aparició de color permet mesurar indirectament la quantitat d'antigen present a la mostra. La coloració es va mesurar per espectrofotometria amb el lector d'absorbància Thermo Scientific Multiskan® EX (1507300, Thermo Fisher Scientific).

### **6.2.9. Immunofluorescència de CD90**

Amb l'objectiu d'identificar la presència de CMMs en el teixit auricular, es van realitzar immuno-histofluorescències de CD90 de seccions de cor de les rates SAOS tractades amb CMMs. Breument, la tècnica va consistir en primer lloc en desparafinar i hidratar les mostres incloses en parafina amb una bateria d'alcohols decreixents. A continuació es van desemmascarar els antígens en un bany amb 10mM de citrat sòdic (C7254, Sigma-Aldrich) a 80°C durant 40 min. Aquest pas serveix perquè tots els antígens que han quedat amagats durant la fixació quedin exposats als anticossos. Seguidament, els talls es van rentar amb PBS (1X), 3 vegades durant 5 minuts i es van bloquejar les unions inespecífiques durant 1 hora a temperatura ambient amb PBS (1X) amb el 0.5% de Tritó X-100 i el 3% de Goat serum (G9023, Sigma-Aldrich). La incubació amb sèrums inhibidors procedents d'animals sans no immunitzats d'una espècie diferent a la de l'anticòs primari i de la mateixa que la de l'anticòs secundari evita la unió de l'anticòs secundari a immunoglobulines del sèrum inhibidor que s'hagin unit inespecíficament al teixit. Després del bloqueig, les mostres es van incubar durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari Anti-Rat CD90, FITC conjugated antibody (MR5001, Caltag, Invitrogen, Life Technologies) diluït 1/200. Es va utilitzar Sudan Black per tal d'emascarar l'auto-fluorescència. Finalment, els portaobjectes es van muntar amb medi ProLong Gold antifade amb DAPI (P36935, Invitrogen, Life Technologies). Com a control negatiu pels dos grups es va utilitzar una mostra a la qual no se li havia afegit l'anticòs Anti-CD90. Com a control positiu, es va realitzar una immuno-citofluorescència de CD90 en CMMs prèviament cultivades a una confluència del 30-40% en portaobjectes o *chamber slides* i fixades amb paraformaldehid al 4%.

### **6.2.10. Hipertròfia cardíaca**

La hipertròfia del cor es va avaluar amb la relació entre el pes del cor i el pes corporal dels animals (Ràtio Hipertròfia = [Pes Cor (g) / Pes rata (kg)]). Per tal de completar l'estudi d'hipertròfia cardíaca, també es van realitzar mesures directes dels gruixos ventriculars de la paret lliure del VE, del septe ventricular (SIV) i de la paret lliure del VD, en seccions transversals de cor a nivell mig. Es van prendre tres mesures de cada regió (VE, SIV i VD), en una fotografia composta de tota la secció del cor (40X) mitjançant el



software d'anàlisi d'imatges analySIS® Image Processing software (Soft Imaging System GMBH, Alemanya). Finalment es va calcular la mitjana de les mesures ( $\mu\text{m}$ ) obtingudes en cadascuna de les regions i es va normalitzar pel pes de cada animal (g) a les 16 setmanes.

#### **6.2.11. Quantificació de fibrosi miocàrdica**

Es va quantificar la fracció de col·lagen a nivell mig dels ventricles i a nivell auricular, a partir de seccions histològiques ( $4 \mu\text{m}$ ) tenyides amb vermell de picrosirius<sup>362</sup>. Es va seguir el mateix protocol detallat al sub-estudi 1.1 (apartat 3.2.10) amb canvis menors.. Es van obtenir 6 fotografies de cada mostra (100X) per l'anàlisi de les aurícules i 4 fotografies (40X) pels ventricles, amb un microscopi Olympus BX51 i càmera DP50 (Olympus Corporation). El mètode de quantificació utilitzat va ser el mateix al descrit al sub-estudi 2.1 (apartat 5.3.8). L'anàlisi morfomètric es va realitzar de manera cega pel mateix investigador mitjançant una codificació de les mostres. Les zones de fibrosi perivascular així com la fibrosi endocàrdica i pericàrdica van ser excloses de l'anàlisi.

#### **6.2.12. Anàlisi estadístic**

Totes les variables analitzades van seguir una distribució normal analitzada amb un gràfic Q-Q i van ser expressades com la mitjana  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana (EEM). Es va utilitzar el test de Grubbs per excloure els *outliers* extrems (un màxim d'un per grup). Les comparacions entre 2 grups es van realitzar utilitzant el test de la *t* d'*Student* de mostres no aparellades. Per l'anàlisi dels nivells plasmàtics d'IL-1 $\beta$  i de la fracció de col·lagen del miocardi, es va realitzar una correlació de *Pearson*. Tots els càlculs estadístics es van dur a terme amb el programa SPSS v16.0 (SPSS Institute Inc, Cary, NC, EEUU). Un valor de  $p < 0.05$  es va considerar estadísticament significatiu.

### 6.3. RESULTATS

#### 6.3.1. Efecte de la SAOS sobre la fibrosi auricular

##### 6.3.1.1. Anàlisi histològic

El model de SAOS crònic de 21 dies no va causar canvis globals ni regionals en la hipertròfia cardíaca. No es van observar canvis en el pes dels animals entre els grups Sham i SAOS, ni tampoc en el pes del cor ni en la ràtio del pes del cor normalitzat amb el pes corporal, tal i com es pot observar en la taula 6.

**Taula 6. Pes corporal, pes del cor i ràtio del pes del cor normalitzada amb el pes corporal.** Els resultats corresponen a la mitjana dels pesos (g) dels animals dels grups: Sham n=14, SAOS n=16.

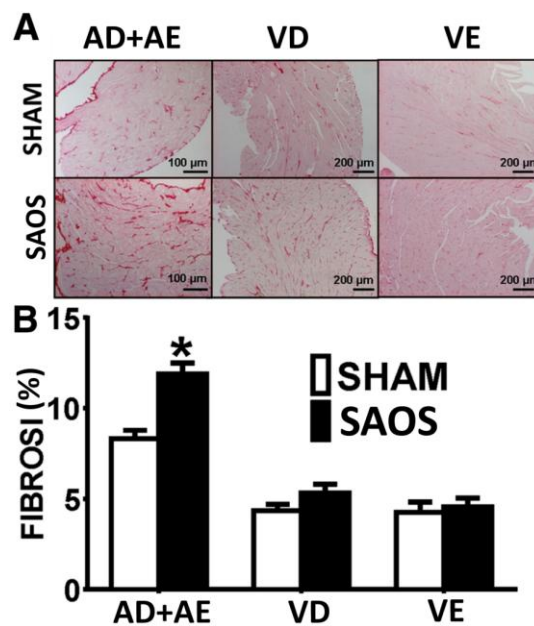
	SHAM	SAOS	Valor p
<b>PES RATA (g)</b>	391.7±8.3	360.9±8.5	0.97
<b>PES COR (g)</b>	1.21±0.02	1.14±0.03	0.08
<b>PES COR (g) / PES RATA (kg)</b>	3.01±0.01	3.02±0.08	0.43

Per altra banda, l'anàlisi de la ràtio dels gruixos de les parets lliures ventriculars ( $\mu\text{m}$ ) normalitzats pels pesos dels animals tampoc va mostrar diferències significatives entre els grups Sham i SAOS, en cap de les regions analitzades (Taula 7).

**Taula 7. Gruixos ( $\mu\text{m}$ ) de les parts lliures del ventricle esquerre (VE), del ventricle dret (VD) i del septe interventricular (SIV) normalitzats pel pes.** Sham n=14, SAOS n=16.

	SHAM	SAOS	Valor p
<b>GRUIX VE/pes rata (g)</b>	6.02±0.41	6.75±0.67	0.34
<b>GRUIX SIV/pes rata (g)</b>	5.54±0.36	6.02±0.55	0.22
<b>GRUIX VD/pes rata (g)</b>	2.34±0.17	2.57±0.25	0.17

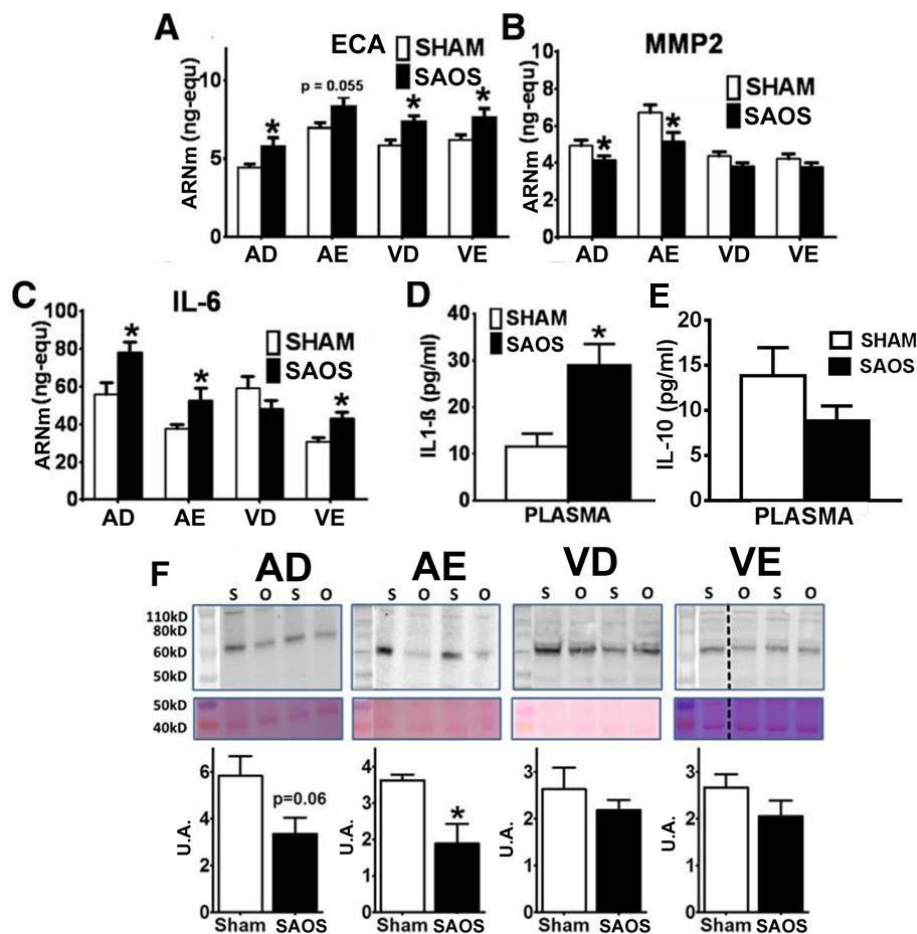
La figura 63 mostra imatges representatives de les preparacions histològiques de VD, VE i d'aurícules tenyides amb vermell de picrosirius. Els resultats de la quantificació de la fibrosi miocàrdica van mostrar un increment significatiu del 43% en l'acumulació de col·lagen intersticial a les aurícules del grup SAOS en comparació amb el grup Sham (Figura 63 B). El dipòsit de col·lagen observat en les preparacions histològiques presentava un patró difús i homogeni, sense presència d'infiltrats irregulars en cap de les mostres analitzades. La quantificació del percentatge de fibrosi a nivell ventricular (VD i VE) no va mostrar cap diferència entre els grups Sham i SAOS.



**Figura 63. Estudi de la fibrosi miocàrdica de les rates Sham i SAOS. A)** Fotografies representatives de seccions tenyides amb vermell de picosirius d'aurícula dreta i aurícula esquerra (AD+AE), ventricle dret (VD) i ventricle esquerre (VE) dels grups Sham i SAOS. **B)** Quantificació del percentatge de col·lagen en AD+AE, VD i VE. Sham (n=14), SAOS (n=16). Els valors corresponen a la mitjana±EEM, \*p<0.05.

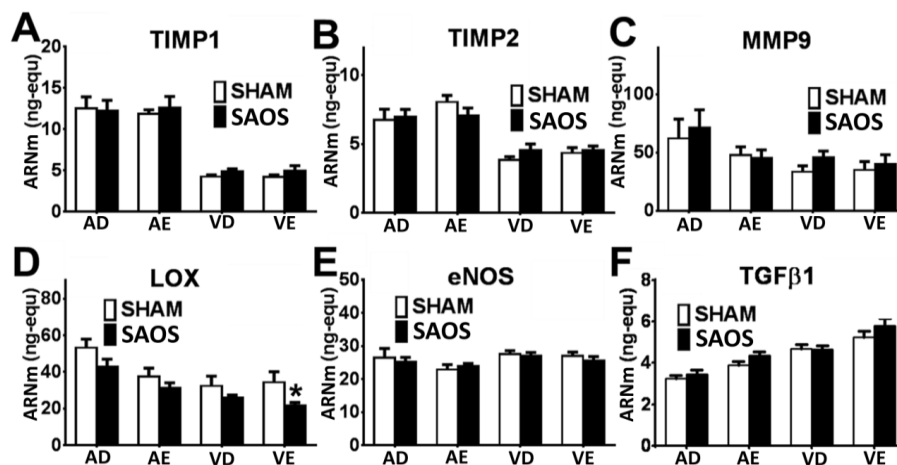
### 6.3.1.2. Expressió d'ARNm i nivells de proteïna

Els resultats de l'anàlisi de l'expressió d'ARNm de gens implicats en la síntesi de col·lagen mostren un increment significatiu de l'expressió d'ECA en l'AD, el VD i el VE, i una tendència a l'increment molt proper a la significança en l'AE ( $p=0.055$ ), en el grup SAOS en comparació amb el grup Sham (Figura 64 A). De forma contrària, l'expressió de TGF- $\beta$ 1 (Figura 64 F) i LOX (Figura 64 D) no va experimentar canvis entre grups. Per tal d'aprofundir en els mecanismes que justifiquen una fibrosi selectiva a les aurícules, es varen estudiar els gens implicats en la degradació de col·lagen. Aquests experiments, van mostrar una disminució de MMP-2 en ambdues aurícules del grup SAOS, però no es van observar canvis en la seva expressió als ventricles (Figura 64 B). L'expressió dels gens d'altres metal·loproteïnases (MMP-9), (Figura 65 C) o d'inhibidors de metal·loproteïnases (TIMP-1, TIMP-2) (Figura 65 A-B) no van mostrar diferències entre els dos grups. Tampoc es van observar canvis en els nivells d'expressió d'eNOS (Figura 65 E). Els nivells d'expressió tant de MMP-3 com de MMP-10 van ser indetectables i no es mostren. Finalment, l'expressió de l'interleuquina IL-6 va ser significativament superior a les aurícules i al VE del grup SAOS, però no va mostrar diferències al VD (Figura 64 C).



**Figura 64. Estudi dels mecanismes implicats en la fibrosi miocàrdica.** **A)** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-equ) d'ECA en AD, AE, VD i VE en els grups Sham (n=14) i SAOS (n=16). **B)** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-equ) de MMP-2. **C)** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-equ) de IL-6. **D)** Nivells circulants (pg/ml) d'IL-1 $\beta$  en plasma. **E)** Nivells circulants (pg/ml) d'IL-10 en plasma. **F)** Quantificació dels nivells de proteïna de MMP-2 amb *Western Blot*. Imatges representatives de les membranes revelades (panell superior), tenyides amb Ponceau S (panell central) i valors de la quantificació normalitzada (panell inferior) (mitjana $\pm$ EEM, \* $p$ <0.05). n=4/6 per grup. La primera columna de la membrana correspon al marcador de pesos molecular (kDa) obtingut amb llum visible. La línia discontinua representa columnes no contigües. S: Sham; O: SAOS; U.A.: Unitats Arbitràries.

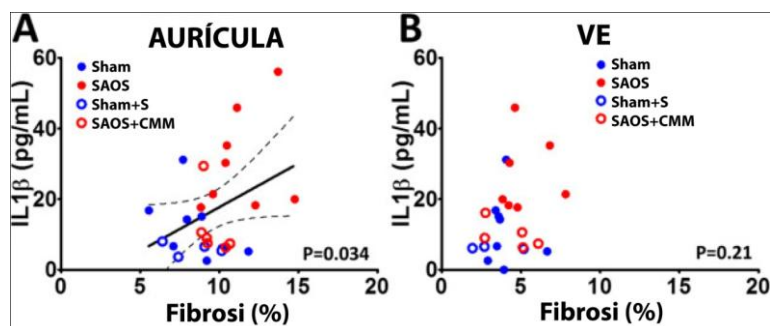
Degut al patró d'expressió d'ARNm de MMP-2, aquesta metal·loproteïnasa es va considerar clau en la regulació de la fibrosi miocàrdica selectiva en les aurícules i, per aquest motiu, es va analitzar els nivells de proteïna de la MMP-2 en les 4 càmeres cardíaques mitjançant la tècnica de *Western Blot*. La figura 64 (F) mostra imatges representatives de les membranes de *Western Blot* i dels resultats de la quantificació dels nivells de proteïna mitjançant densitometria. Els resultats van mostrar que els nivells de proteïna de MMP-2 estaven disminuïts en l'AE de les rates SAOS comparats amb els nivells en l'AE de les rates Sham ( $p=0.03$ ). En l'AD els resultats van mostrar una tendència molt propera a la significança, amb una disminució dels nivells de MMP-2 en el grup SAOS ( $p=0.06$ ). Per altra banda, els resultats no van mostrar diferències en els nivells de MMP-2 entre els grups SAOS i Sham en cap dels dos ventricles (Figura 64 F).



**Figura 65. Expressió d'ARNm en les quatre cavitats cardíaques.** A) Nivells d'expressió d'ARNm (ng-equ) de TIMP-1, de TIMP-2 (B), de MMP-9 (C), de LOX (D), d'eNOS (E) i de TGF-β1 (F) en aurícula dret (AD), aurícula esquerra (AE), ventricle dret (VD) i ventricle esquerre (VE). Sham (n=14), SAOS (n=16). Els valors corresponen a la mitjana±EEM, \*p<0.05.

### 6.3.1.3. Citocines en plasma

Amb l'objectiu d'estudiar els efectes provocats per la SAOS sobre la inflamació sistèmica, es van analitzar els nivells en plasma de la citocina proinflamatorià IL-1β i de la citocina antiinflamatorià IL-10. Els resultats de l'assaig ELISA en plasma van mostrar un augment significatiu dels nivells de d'IL-1β en el grup SAOS en comparació amb el grup Sham (Figura 64 D). Els nivells d'IL-1β van correlacionar positivament amb la fracció de col·lagen present a les aurícules ( $r=0.404$ ,  $p=0.037$ , Figura 66 A), però no van mostrar cap correlació amb la fracció de col·lagen ventricular ( $p=0.21$ , Figura 66 B). Contràriament, no es van observar diferències en els nivells de plasma de la citocina antiinflamatorià IL-10 entre els dos grups (Sham  $11.25\pm 2.96$  pg/ml vs SAOS  $7.85\pm 1.41$  pg/ml,  $p=0.26$ ) (Figura 64 E). A més, els nivells d'IL-10 no van mostrar correlació amb la fibrosi auricular i ventricular ( $p=0.209$  i  $p=0.373$ , respectivament).



**Figura 66. Correlació entre els nivells plasmàtics d'IL-1β i la fibrosi miocàrdica a nivell auricular (A) i al ventricle esquerre (B).** La línia discontinua representa un interval de confiança del 95%.

### 6.3.2. Efecte de les CMMs sobre la fibrosi auricular induïda per la SAOS

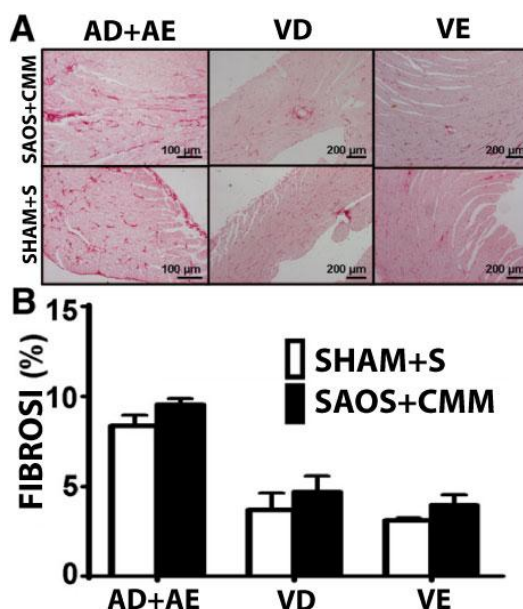
#### 6.3.2.1. Anàlisi histològic

No es van observar diferències en les mesures d'hipertròfia cardíaca entre els grups Sham+S i SAOS+CMM (ràtio pes del cor/pes rata i ràtio del gruix de les parets lliures ventriculars/pes rata), de la mateixa manera que no s'havien trobat anteriorment entre els grups Sham i SAOS (Taula 8).

**Taula 8. Pes corporal (g), pes del cor (g) i ràtio del pes del cor normalitzada amb el pes corporal (g).** Els resultats corresponen a la mitjana dels pesos (g) dels animals dels grups: Sham+S n=7, SAOS+CMM n=8.

	SHAM+S	SAOS+CMM	Valor p
<b>PES RATA (g)</b>	416.5±11.4	377.4±8.6	0.09
<b>PES COR (g)</b>	1.32±0.04	1.28±0.03	1
<b>PES COR (g)/ PES RATA (kg)</b>	3.19±0.10	3.42±0.07	0.75

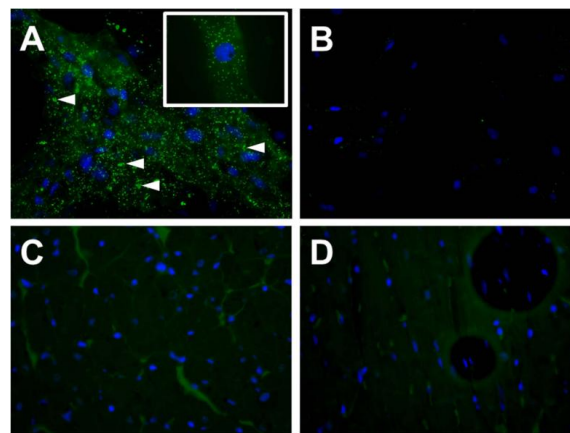
La fibrosi auricular provocada per la SAOS es va revertir amb l'administració de CMM. Com s'observa a la figura 67 B, el percentatge de col·lagen auricular va ser similar entre el grup Sham+S i SAOS+CMM. De la mateixa manera que s'havia observat anteriorment, no es van observar diferències en el percentatge de col·lagen en els ventricles entre els grups SHAM+S i SAOS+CMM (Figura 67 B).



**Figura 67. Estudi de la fibrosi miocàrdica en rates Sham+S i SAOS+CMM. A)** Fotografies representatives de seccions tenyides amb vermell de picrosirius d'aurícules, VD i VE dels grups Sham+S i SAOS+CMM. **B)** Quantificació del percentatge de col·lagen en aurícules, VD i VE. Sham+S (n=7), SAOS+CMM (n=8). Els valors corresponen a la mitjana±EEM.

### 6.3.2.2. Immunofluorescència de CD90

Amb l'objectiu de confirmar la presència al miocardi de les CMMs, es va utilitzar un anticòs anti-CD90 per marcar-les. En la figura 68 es poden observar fotografies obtingudes amb un microscopi de fluorescència de les immunofluorescències realitzades en CMMs cultivades (A: control positiu, B: control negatiu) i en una mostra d'AE del grup SAOS+CMM (C: control positiu, D: control negatiu). Després d'un anàlisi exhaustiu de les mostres, no es van observar cèl·lules positives per CD90 ni en aurícula ni en ventricle de cap secció histològica de cor analitzada. Per altra banda, si que es va observar marcatge positiu en les CMMs cultivades com a control (Figura 68 A), i tal i com era esperable, no es va observar cap tipus de marcatge en el controls negatius (Figura 68 B i D).

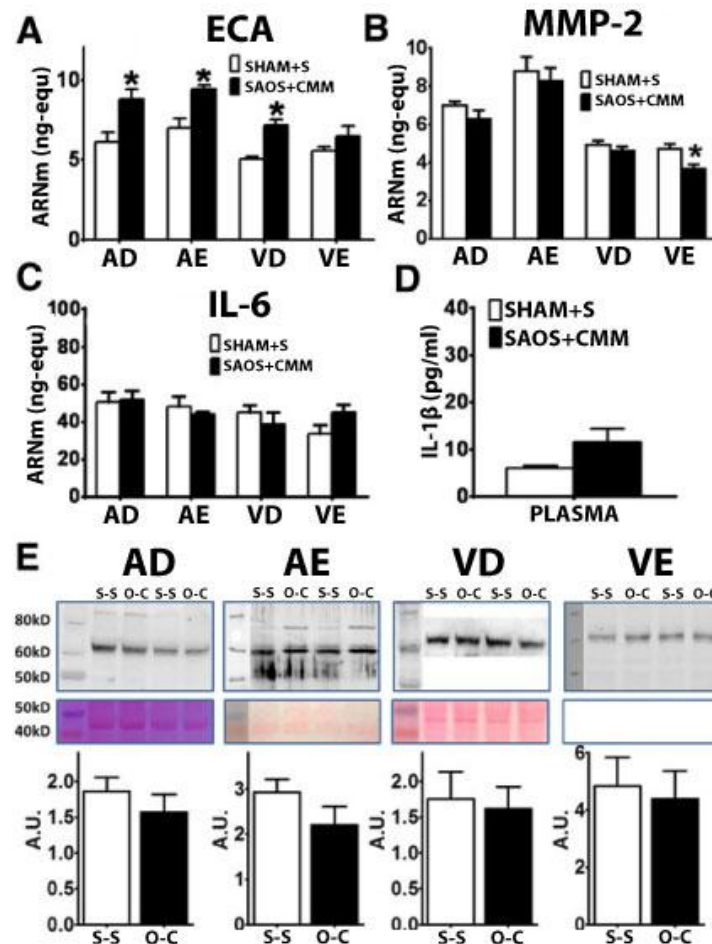


**Figura 68. Immunofluorescència de CD90 en mostres de miocardi.** A) CMMs cultivades *in vitro* marcades amb anticòs CD90 (control positiu), 40x (100x quadre superior de la dreta). B) CMMs sense anticòs CD90 (control negatiu). C) Secció d'aurícula esquerra marcada amb CD90. No s'observa cap cèl·lula CD90 positiva. D) Secció d'aurícula esquerra (control negatiu, sense CD90), augment 40x. Blau: nuclis (DAPI); verd: CD90.

### 6.3.2.3. Expressió d'ARNm i nivells de proteïna

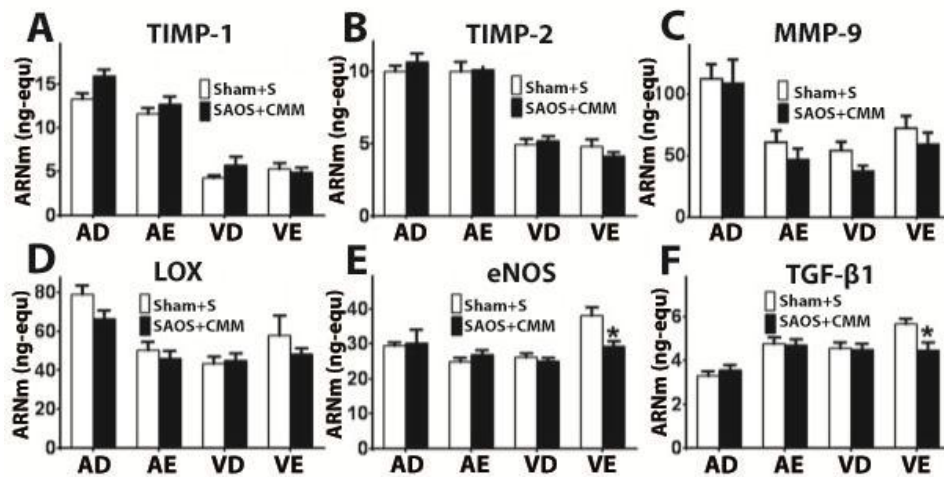
Els efectes beneficiosos de l'administració de CMMs en el grup SAOS no es van acompanyar amb canvis en l'expressió d'ARNm d'ECA. Tal i com s'observa en la figura 70, l'expressió d'ARNm d'ECA en AE, AD com en VD es van trobar significativament incrementats en el grup SAOS+CMM en comparació amb el grup Sham+S (Figura 69 A). Contràriament, l'administració de CMMs si que va ser capaç de contrarestar la disminució de l'expressió de MMP-2, igualant-se amb els nivells del grup Sham+S (Figura 69 B). L'increment de l'expressió d'IL-6 també va ser revertit en el grup SAOS+CMM, el qual no mostrava diferències amb el grup SHAM+S (Figura 69 C). Finalment, no es van observar diferències en l'expressió de la resta de gens associades a la infusió de CMMs, presentant uns valors similars als analitzats prèviament entre els grups Sham+S i SAOS+CMM (Figura 70).

Els resultats de l'expressió d'ARNm de MMP-2 es van confirmar amb l'anàlisi dels nivells de proteïna mitjançant Western Blot. De manera consistent amb l'ARNm, no es van observar diferències amb els nivells de proteïna MMP-2 entre els grups Sham+S i SAOS+CMM ni en l'AD ni en l'AE. Per altra banda, els nivells de proteïna MMP-2 del VE no van mostrar diferències, tot i trobar-se disminuïda l'expressió d'ARNm en el grup SAOS+CMM (Figura 69 E).



**Figura 69. Estudi dels mecanismes implicats en la fibrosi en rates Sham+S i SAOS+CMM.** **A)** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-equ) d'ECA en AD, AE, VD i VE en els grups Sham+S (n=7) i SAOS+CMM (n=8). **B)** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-equ) de MMP-2. **C)** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-equ) de IL-6. **D)** Nivells circulants (pg/ml) d'IL-1 $\beta$  en plasma. **E)** Quantificació dels nivells de proteïna de MMP-2. Imatges representatives de les membranes revelades (panell superior), tenyides amb Ponceau S (panell central) i valors de la quantificació normalitzada (panell inferior) (mitjana $\pm$ EEM, \*p<0.05). n=4/6 per grup. La primera columna de la membrana correspon al marcador de pesos molecular (kDa) obtingut amb llum visible. La línia discontinua representa columnes no contigües. S-S: Sham+S; O+CMM: SAOS+CMM; U.A: Unitats Arbitràries.





**Figura 70. Expressió d'ARNm en els grups Sham+S i SAOS+CMM.** Nivells d'expressió d'ARNm (ng-eq) de TIMP-1 (A), de TIMP-2 (B), de MMP-9 (C), de LOX (D), d'eNOS (E) i de TGF-β1 (F) en AD, AE, VD i VE. Sham+S (n=7), SAOS+CMM (n=8). Els valors corresponen a la mitjana±EEM, \*p<0.05.

#### 6.3.2.4. Citocines en plasma

La figura 69 D mostra els nivells d'IL-β1 en els grups Sham+S i SAOS+CMM. L'increment d'IL-1β en plasma provocat per la SAOS va ser revertit amb el tractament amb CMMs, igualant-se amb els nivells del grup Sham+S.

#### 6.4. CONCLUSIONS

La SAOS ha promogut desenvolupament de fibrosi a les aurícules, creant un substrat arritmogènic que podria explicar l'associació entre la SAOS i la FA. Un increment de l'expressió d'ARNm d'ECA i IL-6 així com una disminució de l'expressió de MMP-2 podria modular la fibrosi selectiva a les aurícules promovent un increment de la síntesi de col·lagen i una disminució de la degradació de col·lagen alhora que augmentant la inflamació a nivell miocàrdic. L'acció proinflamatòria de la SAOS s'ha pogut confirmar a nivell sistèmic, amb la presència de nivells més elevats d'IL-1 $\beta$  plasmàtic respecte al grup Sham.

La fibrosi auricular induïda per la SAOS s'ha previngut amb l'administració intravenosa de CMMs derivades de medul·la òssia, normalitzant l'expressió d'IL-6 i MMP-2 i disminuint els nivells en plasma d'IL-1 $\beta$ .



## **7. DISCUSSIÓ**



## **ESTUDI 1**

En el primer estudi d'aquesta tesi s'han investigat quines són les conseqüències vasculars de l'exercici de resistència d'alta intensitat i de la SAOS en dos models animals crònics, i s'han explorat els possibles mecanismes promotors dels canvis observats. A més, s'ha avaluat la eficàcia de l'administració de CMMs en la prevenció del remodelat vascular induït per la SAOS.

Per una banda, s'ha demostrat que l'exercici d'alta intensitat, contràriament a l'exercici moderat, promou un remodelat advers de la paret de l'aorta acompanyat d'una reducció de les seves propietats elàstiques. Alhora s'ha observat un remodelat estructural patològic de l'artèria caròtida i dels vasos intramiocàrdics associat a l'exercici intens. D'altra banda, el model de SAOS ha promogut una dilatació de l'aorta i un engruïment de la seva paret. A nivell fisiopatològic, s'ha demostrat la importància de l'estrès oxidatiu i de l'activació del sistema RAA en la promoció del remodelat vascular en els dos models animals. A més, s'ha descrit que el patró d'expressió de miARNs a l'aorta es troba modulats per la dosi d'exercici. Finalment, el tractament amb CMMs ha resultat beneficiós, atenuant el remodelat vascular induït per la SAOS.

### **7.1. PATOLOGIA VASCULAR I EXERCICI INTENS**

#### **7.1.1. El model animal reproduceix diferents dosis d'exercici**

Un dels punts centrals de la present tesi és l'anàlisi del remodelat cardiovascular associat a la pràctica d'exercici físic a dosis molt elevades. Amb aquesta finalitat es va utilitzar un model animal de rata corredora en cinta rodant prèviament desenvolupat pel nostre grup de recerca<sup>279</sup>. Partint d'observacions prèvies en rates, orientativament aquest model animal en un humà correspondria a un entrenament físic d'una duració aproximada de 10 anys, al 85%-90% del  $VO_2 \max$ <sup>374</sup>. Tot i que cal ser molt cautelós en la translació directa dels models animals als humans, es pot estimar que aquesta càrrega en una persona jove entrenada, equivaldria a córrer a una velocitat d'uns 15 quilòmetres diaris en poc més d'una hora.

Aquesta càrrega d'exercici es comparà amb els canvis provocats per l'activitat física moderada per tal d'identificar si aquestes dues càrregues representen un contínuum o bé són qualitativament diferents. Amb aquest objectiu, es va adaptar el model animal ajustant tant la intensitat com la duració de l'entrenament físic, basant-nos en la literatura científica prèviament publicada<sup>375</sup>. L'exercici moderat en el nostre model equivaldria per exemple a practicar esports aeròbics no competitiu de manera regular al llarg de 10 anys, al 50-55% del  $VO_2 \max$ <sup>374</sup>.

Finalment, s'adoptà un grup de rates sedentàries, amb una activitat física molt reduïda, i que representen un grau extrem de sedentarisme i inactivitat.

### 7.1.2. Efectes associats a l'exercici

Un dels beneficis més clars de l'entrenament físic en el nostre model animal va ser una reducció del guany de pes. Al llarg de l'estudi, els animals sedentaris van guanyar pes de manera gradual i de forma estadísticament significativa en comparació amb els animals sotmesos a exercici, independentment de la dosi d'exercici.

Al final del protocol d'entrenament, els animals sotmesos a exercici tant moderat com intens tenien una FC en repòs més baixa en comparació amb el grup sedentari. Un gran nombre d'articles han demostrat que l'exercici aeròbic regular en humans causa una reducció de la FC tant en repòs com durant l'exercici sub-màxim<sup>376,377,378</sup>. De fet, la bradicàrdia està considerada l'adaptació més freqüent a l'entrenament físic<sup>377</sup>. Segons l'Institut de Salut Pública de Suècia, seguir un protocol regular d'entrenament físic de resistència d'aproximadament 6 mesos en persones prèviament no entrenades, disminueix la FC en repòs i submàxima de 5 a 10 pulsacions<sup>379</sup>. En un altre estudi realitzat a 30 voluntaris sans d'edats compreses entre els 18 i els 22 anys, es va demostrar que un període mínim de 3 setmanes d'exercici aeròbic regular a una intensitat moderada era suficient per reduir la FC<sup>378</sup>. Els nostres resultats són consistents amb un estudi previ del nostre grup, on ja es va observar una disminució de la FC en el grup d'animals sotmesos a exercici intens associat a un augment del to parasimpàtic o vagal<sup>359</sup>, i també recolza altres estudis experimentals amb models de rata sotmesa a exercici físic<sup>359,380,381</sup>. Tot i la clara evidència de que l'exercici causa bradicàrdia sinusal, les causes d'aquesta associació encara no és coneixen completament<sup>382</sup>. Una probable explicació seria la participació del to autonòmic, amb un increment del to parasimpàtic i una disminució del to simpàtic. Clàssicament s'ha descrit que un increment del to parasimpàtic per una major activitat del nervi vagal<sup>383</sup> jugaria un paper crític en la reducció de la FC. Tanmateix, estudis recents posen de manifest que els atletes podrien tenir una FC intrínseca, en absència del control del to autonòmic, és a dir, menor en comparació amb persones sedentàries<sup>190,384</sup>. Aquesta hipòtesi ha estat corroborada en experiments amb animals<sup>385</sup>. Fins al moment però, la coexistència dels dos mecanismes o bé la implicació d'un d'ells en diferents condicions o disciplines esportives, no ha estat completament descrita.

L'estudi hemodinàmic *in vivo* es va realitzar amb els animals en repòs, tres dies després de l'última sessió d'entrenament. L'anàlisi de la PA tan sistòlica com diastòlica no va mostrar diferències significatives entre els grups experimentals. Així doncs, podem concloure que un entrenament de 16 setmanes no va contribuir a reduir els paràmetres

de PA, independentment de la dosi d'exercici. En la literatura científica, la resposta de la PA a l'exercici aeròbic no ha estat completament investigada en subjectes normotensos. Dos metanàlisis de Fagard *et al.*<sup>235,386</sup> en els que es van incloure estudis amb l'exercici aeròbic de resistència com a única intervenció ( $\geq 4$  setmanes) en subjectes tant normotensos com hipertensos, van mostrar una reducció global de la PA ambulatoria (mesurada al llarg del dia) amb l'exercici de resistència. Tanmateix, els canvis en la PA van ser molt més pronunciats en els grups de pacients hipertensos en comparació amb els grups de subjectes normotensos. Curiosament es va observar que la reducció de la PA va ser menys marcada quan la duració total de l'estudi era més llarga<sup>235,386</sup>. En general en estudis experimentals amb animals, els canvis a llarg termini que provoca l'exercici aeròbic sobre la PA són mínims<sup>387</sup>.

### 7.1.3. Efectes associats a la dosi d'exercici

#### 7.1.3.1. Remodelat estructural de l'aorta

Els resultats demostren que l'exercici intens indueix un remodelat diferencial segons la regió de l'aorta analitzada. Mentre que l'anàlisi histològic de l'aorta toràcica descendent no va mostrar diferències ni en el gruix de la túnica mitjana ni en l'àrea de la llum vascular, l'estudi ecocardiogràfic va mostrar un diàmetre significativament incrementat a nivell de l'arrel aòrtica en els animals del grup INT respecte al grup SED. El diàmetre de l'aorta ascendent tampoc va presentar diferències entre grups per ecocardiografia. Per raons de viabilitat tècnica no es va poder realitzar un estudi ecocardiogràfic a nivell de l'aorta toràcica descendent als animals.

En línia amb els nostres resultats, s'ha documentat que l'exercici aeròbic regular no provoca canvis del gruix de la paret de grans artèries elàstiques en individus sans<sup>388</sup>. Tanmateix, s'ha observat un augment del diàmetre de la llum vascular de l'aorta abdominal, de l'artèria subclàvia i de l'artèria caròtida en ciclistes i corredors de llarga distància en comparació amb individus sedentaris<sup>222</sup>. Altres estudis han observat un increment de la llum de l'artèria femoral en ciclistes, corredors de mitja distància i triatletes<sup>223,225</sup>. De forma coherent amb els nostres resultats, s'ha demostrat que els esports de resistència de les modalitats on la intensitat és molt elevada (p.ex.: ciclisme, natació), estan associats a increments lleus però significatius de les dimensions de l'arrel aòrtica<sup>389</sup>. Un metanàlisi publicat l'any 2013 va concloure que els atletes d'elit presenten un diàmetre de l'arrel aòrtica més gran a nivell del sinus de Valsalva i de l'anell aòrtic, tot i que sembla ser una diferència clínicament poc significativament<sup>390</sup>. Un estudi recent de Boratia *et al.*<sup>391</sup> on es van prendre mesures ecocardiogràfiques a 3.128 esportistes d'elit corrobora aquests resultats, mostrant un augment marcat de les dimensions de l'arrel aòrtica en els esportistes amb un alt component dinàmic tot i que els valors observats es



mantenen dins del rang de normalitat de la població general. Per tant, sembla ser que alguns tipus d'artèries elàstiques podrien tenir una major plasticitat a patir un remodelat expansiu, és a dir una dilatació, en resposta a l'exercici de resistència en comparació amb altres. L'aorta és el primer segment arterial del cos, directament connectat al cor. Tanmateix, els diferents segments de l'aorta poden ser més o menys propensos a patir canvis en la seva morfologia o composició de la seva paret. En primer lloc la regió anatòmica, amb regions amb presència de curvatures més pronunciades, poden modificar la tensió arterial, creant un flux turbulent, que pot tenir efectes diferents sobre la paret. Per exemple, s'ha documentat que l'aorta ascendent és menys sensible a patir aterosclerosi en comparació amb l'arc aòrtic<sup>392,393</sup>. En segon lloc, les propietats elàstiques de la paret característiques de cada regió permeten que l'aorta tingui una major o menor capacitat d'esmoreïment dels canvis de pressió generats pel bombeig cíclic de sang en cada batec cardíac (funció de Windkessel). Dins de l'aorta humana, s'ha documentat un increment de la rigidesa arterial de les zones més proximals a les zones més distals<sup>394</sup>. Per tant, sembla coherent que l'arrel aòrtica, el segment més proximal al cor, sigui més sensible a patir canvis en la seva morfologia per ser el primer en recepcionar el volum de sang expulsat del VE a una elevada pressió.

La MEC dels vasos és una estructura dinàmica i activa que juga un paper fonamental en la regulació de la funció vascular. Això s'aconsegueix gràcies a les diferents propietats dels elements que la conformen: mentre que l'elastina té una alta capacitat de distensió, el col·lagen és un component molt rígid (entre 100-1000 vegades més rígid que les fibres elàstiques). En conseqüència, una alteració de la composició i morfologia de la MEC pot afectar les propietats mecàniques de l'artèria, disminuint la seva capacitat de distendre's<sup>395,396</sup>. En el nostre treball, l'anàlisi histològic de la composició de la túnica media de l'aorta toràctica descendent no va mostrar diferències entre els grups SED i MOD. De manera oposada, en el grup INT es va observar una major elongació de les làmines elàstiques en comparació amb el grup SED. Aquesta major elongació va anar acompanyada d'un major número de ruptures de les làmines elàstiques i un increment del percentatge de col·lagen de la túnica media en comparació amb els grups SED i MOD. Amb l'envelliment en absència de malaltia, el contingut de col·lagen de la túnica media de les artèries de conducció incrementa gradualment provocant una reducció en la proporció d'elastina<sup>397</sup>. L'estrès mecànic (les làmines elàstiques al llarg de la vida estan sotmeses a 3 bilions de cicles d'extensió i retrocés), així com processos fisiopatològics relacionats amb l'edat, com la calcificació, la glicòlisi i la peroxidació lipídica, contribueixen a augmentar la fragilitat de l'elastina i la seva fragmentació<sup>398</sup>. Els nostres resultats suggereixen que la pràctica continuada d'exercici intens podria sotmetre a l'aorta a un estrès crònic que podria conduir a una fatiga i fragmentació dels elements elàstics de la

túnica media i a un major dipòsit de col·lagen, contribuint a una pèrdua d'elasticitat arterial.

### 7.1.3.2. Canvis funcionals de l'aorta

L'estudi hemodinàmic realitzat als animals *in vivo* a les 16 setmanes no va mostrar diferències significatives en la Pas i la Pad a nivell de l'aorta toràcica ascendent, entre els diferents grups experimentals. Tot i així, la PP en el grup INT es va trobar significativament elevada respecte al grups MOD i SED. Mentre que la PA és similar a les artèries de gran calibre, s'ha vist que la PP pot variar en funció de la rigidesa arterial. De fet, el component pulsàtil de la PA central (la PP) està estretament correlacionat amb l'aparició d'accidents cardiovasculars i a una major rigidesa de l'aorta<sup>399,400</sup>. A més, la PP és una mesura molt acurada a l'hora de reflectir les condicions de càrrega del VE<sup>400</sup>. En consonància amb l'estudi hemodinàmic, els resultats de l'estudi ecocardiogràfic revelen que la pràctica d'exercici intens en el nostre model disminueix de manera significativa la pulsatilitat de l'aorta ascendent en el grup INT, en comparació amb els grups SED i MOD. A més, l'estimació dels índexs de rigidesa arterial (índex  $\beta$  i Ep) es van trobar incrementats en els animals INT en comparació amb els altres grups. De manera contrària, l'exercici moderat en el nostre model animal promou un increment de l'elasticitat de l'aorta ascendent, reflectida per una pulsatilitat més elevada mitjançant ecocardiografia. Aquest canvi resulta beneficiós ja que significa que l'aorta d'aquests animals té una major capacitat d'incrementar el seu diàmetre durant la sístole per tal de recollir i emmagatzemar un volum de sang adequat, i disminuir el seu diàmetre durant la diàstole amb l'objectiu d'incrementar el flux sanguini i ser més eficient a l'hora de bombejar la sang durant l'exercici.

Tot i que molts estudis han demostrat que l'exercici aeròbic regular és eficaç en la prevenció i reversió del increment de rigidesa arterial en humans sans<sup>401</sup>, l'efecte sobre la rigidesa arterial associada a diferents modalitats o dosis d'exercici encara no ha estat investigada. Generalment les persones que practiquen un tipus d'exercici de resistència o aeròbic solen presentar una rigidesa arterial disminuïda<sup>401-403</sup>. De manera consistent als nostres resultats, estudis clínics tant transversals com longitudinals indiquen que els individus amb una major capacitat aeròbica<sup>404</sup> i els individus que realitzen programes d'entrenament aeròbic de baixa intensitat presenten una rigidesa arterial inferior<sup>405</sup> en comparació amb individus sedentaris. En atletes, alguns estudis<sup>406,407</sup> han observat un increment de l'elasticitat aòrtica com a adaptació a l'exercici de resistència. No obstant, i en línia amb els nostres resultats, estudis recents han evidenciat una disminució de l'elasticitat arterial en atletes d'elit<sup>408</sup> que practiquen uns nivells d'esport molt intensos i de llarga durada. Dades d'un estudi recent van mostrar un augment de la rigidesa aòrtica acompanyada d'un increment de la Pas, la Pad i la PP en corredors de marató<sup>409</sup>. En un

altre estudi realitzat a corredors d'ultra maratons també es va observar una disminució de l'elasticitat de grans artèries en comparació amb individus control actius<sup>410</sup>.

Per altra banda, els resultats de l'estudi *ex vivo* mitjançant miografia dels anells aòrtics va permetre estudiar la funció endotelial de l'aorta en resposta a l'exercici. Els resultats van mostrar un augment de la resposta vasodilatadora màxima ( $E_{max}$ ) al Cch de l'aorta dels grups exercici (MOD i INT) en comparació amb el grup SED. Per tant, en aquest cas, la millora de la funció endotelial de l'aorta no es modifica per la dosi d'exercici. Aquest resultat va en línia amb estudis previs experimentals, on s'ha observat una millora de la resposta vasodilatadora dependent d'endoteli de l'aorta associada a l'exercici<sup>411-413</sup>. En concret, s'ha observat una millora de la vasodilatació dependent d'endoteli en l'aorta de rates corredores en cinta rodant després de 4 setmanes d'entrenament<sup>412</sup> i en conills corredors a les 8 setmanes<sup>414</sup>. En humans, s'ha demostrat que la millora de la vasodilatació en resposta a l'exercici està modulada per un increment de la biodisponibilitat del NO<sup>415,416</sup>, per tal que l'endoteli vascular s'adapti a l'augment del *shear stress* produït per l'increment de flux sanguini durant l'exercici aeròbic continuat<sup>417-419</sup>. Aquesta millora s'ha demostrat principalment en subjectes amb patologia cardiovascular o amb factors de risc cardiovascular, tant en artèries de conducció com en artèries de resistència<sup>420</sup>. Tot i així, els resultats en individus sans asimptomàtics són menys consistents<sup>163,421</sup>. Els estudis que han demostrat una millora de la funció endotelial, similar a la observada en el present treball, suggereixen que l'impacte sobre l'endoteli preservat s'aconsegueix únicament quan la intensitat i duració de l'exercici és com a mínim moderada o alta. L'evidència científica demostra que aquesta millora està associada a una major activitat de la sintasa d'NO endotelial<sup>422,423</sup> i s'ha documentat tant un increment de l'expressió d'eNOS<sup>423,424</sup>, com un increment de la fosforil·lació del seu domini d'activació (Ser1177)<sup>425</sup> i una estabilització del seu estat dimèric<sup>426,427</sup>. Molts estudis han demostrat que l'exposició de les CE de l'aorta a un increment del *shear stress*<sup>428,429</sup> i a altes concentracions d'agonistes adrenèrgics<sup>430</sup> durant l'exercici, pot conduir a una major activitat d'aquest enzim. En el present estudi i amb l'objectiu de determinar el paper del NO en la resposta vasodilatadora al Cch, es va estudiar la reactivitat vascular de l'aorta amb la presència de l'inhibidor de la sintasa d'NO endotelial (L-NMMA). La inhibició de la sintasa d'NO amb L-NMMA va abolir quasi completament la resposta de relaxació al Cch en tots els grups, confirmant que l'NO juga un paper crític en la millora de la resposta vasodilatadora associada a l'exercici.

D'altra banda, la resposta vasoconstrictora de l'aorta a la FE, un agonista dels receptors adrenèrgics  $\alpha_1$  presents al múscul llis vascular, es va trobar reduïda de manera significativa en els grups MOD i INT, en comparació amb el grup SED. Aquest resultat recolza estudis experimentals previs on s'ha observat una menor reactivitat a factors

vasoconstrictors adrenèrgics associada a l'exercici. Per exemple, estudis realitzats en aorta de rata indiquen una resposta vasoconstrictora atenuada a la FE i a la norepinefrina en resposta a l'exercici<sup>431,432</sup>. En aorta de porc també s'ha observat una disminució de la reactivitat a la norepinefrina per l'exercici<sup>433</sup>. Per altra banda, estudis com el de Delp *et al.*<sup>413</sup>, tot i demostrar un increment de la resposta vasodilatadora a l'acetilcolina en l'aorta abdominal de rates Sprague Dawley normotenses sotmeses a 10-12 setmanes d'exercici, no van observar una disminució de la resposta vasoconstrictora a la FE ni a la norepinefrina. Edwards *et al.*<sup>434</sup>, en un estudi en rates corredores i nedadores, tampoc va observar diferències en la resposta vasoconstrictora de l'aorta abdominal a la norepinefrina entre els grups exercici i sedentaris. Probablement la gran variabilitat dels resultats anteriors pot ser explicada pel tipus i intensitat d'entrenament aplicat (voluntari en roda, natació, cinta rodant...) i per les diferents espècies i soques d'animals utilitzades. En general però, existeix un consens sobre l'atenuació de la vasoconstricció adrenèrgica causada per l'exercici aeròbic. Amb l'objectiu de determinar si aquest efecte era conseqüència de canvis en els receptors adrenèrgics  $\alpha_1$  del múscul llis vascular o bé si estaven modulats per l'endoteli vascular, es va examinar la resposta vasoconstrictora a la FE inhibint la producció d'NO amb la presència de L-NMMA. En aquesta condició, la resposta màxima a la FE en tots els grups va incrementar, anul·lant les diferències entre el grup SED i el grup MOD. A més, l'augment de la  $E_{max}$  es va trobar més marcat en el grup MOD en comparació amb el grup SED. Aquest resultat indica que l'NO alliberat per l'endoteli juga un paper molt important atenuant de manera indirecta la resposta vasoconstrictora a la FE en resposta a l'exercici moderat. Sorprenentment, la resposta vasoconstrictora de l'aorta del grup INT en presència de L-NMMA va ser major en comparació amb els grups MOD i SED. La hiperreactivitat de l'aorta en condicions no dependents d'eNOS suggereix que, malgrat existir una forta modulació endotelial per part del NO, una major reactivitat a la FE podria involucrar una alteració a nivell de la capa del múscul llis vascular probablement per un increment del número o sensibilitat dels receptors adrenèrgics o per un desequilibri del flux d'entrada de  $Ca^{2+}$ . En la literatura, els efectes de l'exercici en la resposta vasoconstrictora independent d'endoteli han estat poc investigats. Estudis experimentals en animals han observat una lleugera reducció de la resposta al KCl, un vasoconstrictor amb acció directa sobre les VSMCs no dependent d'endoteli, en resposta a episodis aguts d'exercici aeròbic<sup>435</sup> i moderat<sup>431</sup>. Un altre estudi en rates hipertenses també va mostrar una reducció de la resposta al KCl en artèries mesentèriques després d'una sessió d'exercici de resistència<sup>436</sup>. Tanmateix, hi ha pocs estudis on s'analitzin els efectes crònics de dosis més elevades d'exercici físic sobre la resposta al KCl. Els canvis en la senyalització del calci també poden afectar el to de les VSMCs. Estudis com el de Bowles *et al.*<sup>437</sup> en un model porcí han demostrat que la densitat de canals de  $Ca^{2+}$  dependents de voltatge tipus L es troba incrementada en

artèries coronàries amb l'entrenament de resistència (16-20 setmanes), augmentant en conseqüència el to vascular. Paradoxalment, l'estudi de *Chen Y. et al.*<sup>438</sup> va mostrar que l'exercici d'alta intensitat durant 8 setmanes agreujava el remodelat advers del múscul llis vascular de les artèries mesentèriques en rates SHR, incrementant l'expressió dels canals tipus L ( $Ca_{v1.2}$ ). La probable resposta fisiològica com a conseqüència d'un increment d'aquests canals seria un augment global de la resposta vasoconstrictora independent d'endoteli. Tanmateix, aquest abordatge no està inclòs en el present estudi i, en global, els nostres resultats apunten a una millora funcional de l'endoteli a l'exercici amb una capacitat vasodilatadora augmentada i una resposta vasoconstrictora disminuïda, independentment de la dosi d'exercici. La modulació dels canals de calci dependents de voltatge de les VSMCs de l'aorta podria ser un mecanisme de gran importància per entendre la resposta diferencial a la FE modulada per la dosi d'exercici.

### 7.1.3.3. Mecanismes implicats en el remodelat aòrtic

L'increment de la rigidesa aòrtica és una característica distintiva de les malalties cardiovasculars. S'ha demostrat que factors de risc cardiovascular com l'edat<sup>439</sup>, el tabaquisme<sup>440</sup>, la diabetis<sup>441</sup> i la hiperlipidèmia<sup>442</sup> augmenten la rigidesa aòrtica. Fins i tot diferents estudis epidemiològics han identificat la rigidesa aòrtica com a predictor independent del desenvolupament de malaltia coronària i d'ictus, així com de l'aparició d'accidents cardiovasculars i de mortalitat<sup>443,444</sup>. La rigidesa arterial depèn de la composició estructural de la paret dels vasos, del to de les cèl·lules musculars llises i de la PA.

Les carreres de llarga distància com les maratons són un tipus d'exercici aeròbic extremadament vigorós i competitiu que requereix un entrenament regular a intensitats molt elevades, però no està clar quins són els mecanismes fisiològics que podrien promoure l'increment de la rigidesa arterial associada a aquest tipus d'exercici. O'Rourke *et al.* l'any 2010<sup>445</sup> van introduir el terme *vascular aging continuum* definit com el deteriorament progressiu de l'estructura vascular amb una degeneració de la capa mitjana, un increment de la rigidesa i una dilatació aòrtica. Segons aquest principi, els esdeveniments cardiovasculars associats a l'edat en pacients sense factors de risc es desencadenen arrel d'una fatiga i posterior fractura de les làmines elàstiques de l'aorta. En base a aquest principi, en el nostre model animal els canvis en la composició de la MEC de l'aorta observats podrien ser causa de l'estrès repetitiu i excessiu (cicles d'estiraments i distensions) al qual es troba sotmesa la paret aòrtica durant l'exercici físic intens. Aquesta pressió mantinguda en el temps (estrès mecànic), conjuntament amb altres factors (estrès oxidatiu, substàncies vasoactives,...), podrien desencadenar el desgast dels seus elements elàstics de manera precoç, promovent el remodelat patològic de la paret aòrtica i incrementant la seva rigidesa.

L'estrès oxidatiu també juga un paper molt important en la promoció del remodelat vascular<sup>397</sup>. La pràctica regular d'exercici moderat s'ha demostrat que redueix l'estrès oxidatiu sistèmic i augmenta els mecanismes antioxidants del nostre organisme. Existeixen diversos estudis epidemiològics en humans que han demostrat que les persones que segueixen un entrenament físic regular, tenen uns nivells circulants de marcadors d'estrès oxidatiu inferiors en amb persones sedentàries<sup>446</sup>. Tanmateix, en situacions molt oxidants, com per exemple durant l'exercici físic d'alta intensitat, durant el qual la despesa d'oxigen pot arribar a incrementar de 10 a 20 vegades i a causa de l'elevat *shear stress*, s'incrementa la generació de ROS. En el present treball, la quantificació *ex vivo* mitjançant el DHE va mostrar una major producció de superòxid ( $O_2^-$ ) a la túnica mitjana de l'aorta en el grup INT en comparació amb els grups SED i MOD. D'altra banda, no es van observar diferències significatives entre els grups SED i MOD. Per tant, els nostres resultats apunten a un increment local d'estrès oxidatiu a l'aorta associat a l'exercici intens que podria ser clau en el procés de remodelat patològic observat.

A nivell sistèmic, l'exercici físic d'alta intensitat en homes sans s'ha associat a un increment agut de peroxidació de lípids, mesurats després de l'exercici a través dels nivells plasmàtics de malondialdehid (MDA)<sup>446</sup>. Tanmateix, aquests valors se solen normalitzar un cop finalitzada la sessió d'exercici. L' $O_2^-$  té la capacitat de reaccionar amb el NO per generar peroxinitrit, un potent oxidant que reacciona amb una gran quantitat de molècules biològiques com lípids, proteïnes i ADN, activant cascades de senyalització cel·lulars que acaben promovent processos d'apoptosi i necrosi, promovent la disfunció endotelial<sup>447</sup>. Un estudi en humans de *Goto et al.*<sup>415</sup> va investigar els efectes crònics de diferents intensitats d'exercici (intensitat baixa: 25%  $VO_2$  max; moderada: 50%  $VO_2$  max i alta: 75%  $VO_2$  max) sobre la funció vasodilatadora depenent d'endoteli en humans. Els resultats d'aquest estudi van demostrar únicament una millora de la resposta vasodilatadora en absència d'estrès oxidatiu en el grup d'exercici moderat mentre que l'exercici intens va promoure un increment de l'estrès oxidatiu mesurat pels nivells sèrics de MDA-LDL. Cal tenir en compte que el balanç entre els ROS com el superòxid i la producció de NO juguen un paper crític en el manteniment de la funció endotelial normal. Tot i que durant la pràctica d'exercici es generen contínuament ROS, el grau de dany oxidatiu depèn principalment de l'habilitat del cos per contrarestar aquesta producció de ROS i mantenir el balanç redox cel·lular. Els mecanismes de defensa antioxidants promoguts per l'exercici no han estat investigats en la present tesi, però podrien tenir un paper crucial en el manteniment del balanç redox a l'endoteli, exercint un efecte protector fins i tot a altes dosis d'exercici<sup>411</sup>.

Les vies de senyalització intracel·lulars activades durant l'exercici a causa de l'elevat *shear stress*, involucren una activació de la inflamació i un increment en la síntesi de diferents pèptids vasoactius com l'Ang-II. L'anàlisi mitjançant *Western Blot* va mostrar un increment significatiu dels nivells de proteïna ECA-1 en les aortes de les rates INT, en comparació amb les rates SED i MOD. L'ECA-1 és l'encarregada de la conversió de l'Ang-I a Ang-II. Alguns dels efectes vasculars de l'Ang-II, a través de la unió als receptors tipus 1 (AT<sub>1</sub>) presents principalment al múscul llis vascular, són promoure la hipertròfia i hiperplàsia de les VSMCs<sup>448</sup>, així com afavorir la producció de MEC<sup>449</sup> (efecte pro-fibròtic) i la síntesi de mediadors proinflamatoris<sup>450</sup>. A la llum dels nostres resultats, l'augment dels nivells de proteïna ECA-1 per l'exercici intens podria promoure de forma indirecta el remodelat patològic de la paret aòrtica observat en el present estudi. A més, s'ha demostrat que l'Ang-II és capaç d'activar de manera directa l'oxidasa NAD(P)H<sup>451</sup>. L'oxidasa NAD(P)H és un enzim present a les CEs i a les VSMCs, i és la font principal de generació de ROS als vasos. Una hiperactivació d'aquest enzim condueix a una generació excessiva de ROS, activant una sèrie de processos moleculars que finalment poden contribuir al dany vascular<sup>452</sup>. Un estudi experimental en rates hipertenses per infusió d'Ang-II va demostrar un increment de la producció d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, predominantment a la capa mitjana, a través de l'activació de la oxidasa NAD(P)H<sup>453</sup>.

#### 7.1.3.4. Anàlisi de l'expressió de miARNs implicats en el remodelat aòrtic

Els miARNs són un mecanisme de control gènic amb una importància cada cop més reconeguda. A més, els resultats obtinguts en models animals com a teràpia són esperançadors en diverses patologies, entre elles les MCVs<sup>454,455</sup>. En principi, els mimetitzadors de miARN es poden usar per elevar la expressió dels miARNs beneficiosos, mentre que els inhibidors de miARNs es poden administrar amb l'objectiu de bloquejar la activitat de certs miARNs amb efectes patogènics i frenar la progressió de la malaltia.

En una última part d'aquest estudi es va voler descriure el patró d'expressió de miARNs implicats en el remodelat vascular associat a l'exercici, en base a l'anàlisi per *microarray* de l'aorta toràctica descendent, on s'han observat la majoria del canvis estructurals. S'ha vist que les modificacions epigenètiques tenen un paper molt important en el remodelat vascular<sup>81</sup>. Tot i que es coneix que l'exercici afecta de manera directa les propietats de la paret dels vasos i la funció endotelial, fins al moment existeixen pocs estudis en humans que investiguin l'impacte de l'exercici en les modificacions epigenètiques de les CEs i les VSMCs. Estudis recents han demostrat els miARNs participen de manera important en la regulació de gens angiogènics en les CEs i de la funció de les cèl·lules mare endotelials<sup>456,457</sup>. En models experimentals, un estudi de Wu *et al.*<sup>458</sup> va mostrar que els ratolins del model d'aterosclerosi (ApoE<sup>-/-</sup>) sotmesos a exercici, presentaven nivells

reduïts d'Ang-II, ET-1, plaques arterioscleròtiques i cèl·lules espumoses en comparació amb ratolins control i que, aquestes diferències estaven associades a una baixa expressió del miR-155, i una sobreexpressió del miR-126 en els animals exercici. Degut a que el miR-155 inhibeix directament l'expressió d'eNOS i una baixa expressió del miR-126 promou la disfunció endotelial, aquest estudi va aportar la primera evidència que l'exercici regula la funció endotelial a través de mecanismes epigenètics.

Els resultats obtinguts en el nostre model animal demostren que hi ha una expressió diferencial de miARNs a l'aorta associada a la dosi d'exercici. Concretament, l'exercici INT promou la sobreexpressió dels miR-132-3p, miR-212-3p, miR-146b-3p i miR-326-5p. Per altra banda, el miR-29b-3p es troba significativament elevat al grup d'exercici MOD en comparació amb els grups SED i INT. De tots els miARN diferencialment expressats, es van poder validar per qRT-PCR tots excepte el miR-326-5p, l'expressió del qual va ser massa baixa. De l'anàlisi de xarxes i interaccions entre els miRNAs expressats diferencialment, s'ha de remarcar que aquests miRNAs participen en la regulació de vies de senyalització implicades en la interacció amb la MEC, la contracció de les VSMCs, el sistema RAAS, la via de senyalització del TGF- $\beta$  o bé la regulació del citoesquelet d'actina. Totes aquestes vies de senyalització són claus en el procés de remodelat vascular.

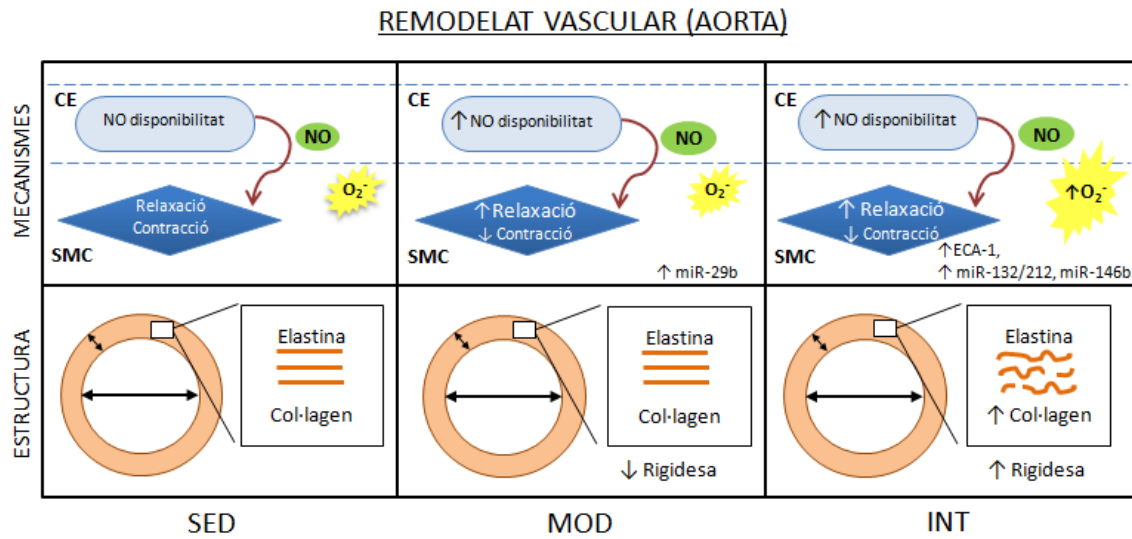
La família de miR-132/212 s'ha trobat implicada en la regulació de processos com la hipertròfia cardíaca<sup>459</sup> i la hipertensió<sup>460</sup>. Els miR-132 i miR-212 són miARNs altament conservats, que pertanyen a la mateixa família i s'agrupen al genoma formant un *cluster*. Es transcriuen conjuntament sota la regulació del gen CREB (*cAMP response element binding protein*), el qual es troba regulat per l'Ang-II. El paper d'aquests miARNs en la resposta a l'Ang-II s'ha demostrat tant *in vitro* en cultius de VSMCs com també en estudis *in vivo* en aortes de ratolins<sup>461</sup>. En un estudi de Schneider M. *et al.*<sup>460</sup> es va observar una sobreexpressió d'aquests miARNs en resposta a l'Ang-II al cor i a la paret de l'aorta de rates SHR, mentre que la seva expressió es trobava disminuïda a l'aorta mamària de pacients tractats amb bloquejadors dels receptors d'Ang-II. En un altre estudi del mateix grup, es van identificar diferents gens diana implicats en les vies de senyalització de l'Ang-II i de l'ET-1 suggerint que la família de miR-132/212 regula les funcions de l'Ang-II als fibroblasts cardíacs. A més sembla ser que els miR-132/212 també participen en la regulació de la funció endotelial. Un estudi *in vitro* va demostrar la implicació del miR-212 en la supressió de gens endotelials molt importants promovent disfunció endotelial<sup>462</sup>. De manera similar, un altre estudi va concloure que el miR-132 actua com a supressor de l'expressió de p120RasGAP a l'endoteli, afavorint el procés de neovascularització patològica<sup>463</sup>. D'altra banda el miR-146a, que trobem en el nostre model sobreexpressat en l'aorta del grup INT, s'ha demostrat que estimula la proliferació de les VSMCs a través



del KLF4 (Krüppel-like factor 4)<sup>81</sup>. Aquest estudi va observar que la transfecció d'oligonucleòtids *antisense* contra el miR-146a a l'artèria caròtida de rata després d'una lesió, va ajudar a atenuar la hiperplàsia de la neoíntima<sup>464</sup>. A més, en el *Tampere Vascular Study*, l'expressió del miR-146b-5p es va trobar significativament incrementada en artèries de pacients amb aterosclerosi i que la seva expressió acompanyada d'una menor expressió de diversos gens diana predits per aquest miARN<sup>465</sup>. Així doncs, una sobreexpressió tant dels miR-132/212 com del miR-146 associada a l'exercici intens, podria contribuir al remodelat patològic de l'aorta observat en el nostre model animal. Tanmateix, un estudi de l'expressió dels gens diana per aquests miARNs en el teixit aòrtic i els efectes de la seva inhibició serien necessaris per tal de confirmar la seva implicació en el remodelat vascular observat.

La família del miR-29 ha demostrat tenir un paper en la regulació de gens implicats en la homeòstasi de la MEC. En el nostre model, hem observat un increment significatiu d'aquest miARN en el grup MOD, en comparació amb nivells més baixos en els grup SED i MOD. La inhibició del miR-29b en dos models animals d'aneurisma d'aorta abdominal (AAA), va incrementar l'expressió de gens que codificaven pel col·lagen i l'elastina i va reduir l'expressió de gens codificants per MMPs, disminuint la progressió del AAA en aquests ratolins<sup>466</sup>. L'estudi de *Song et al.*<sup>467</sup> va demostrar que el miR-29b reduïa la proliferació i migració *in vitro* de les VSMCs d'aorta de rata, regulant l'expressió del Mcl-1 (*Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*) i de la MMP-2. Aquest mateix estudi va observar una reducció dels nivells de miR-29b en un model murí de lesió de l'artèria caròtida i va demostrar que una sobreexpressió local del miR-29b inhibia la formació de la neoíntima. Un altre estudi va demostrar que l'aldosterona, a través del receptor mineralcorticoide, redueix el miR-29b *in vivo* en l'aorta de ratolí i en cultius primaris de VSMCs humanes. Segons aquest estudi, nivells baixos de miR-29b condueixen a una major producció de MEC i canvis en la proliferació cel·lular i en la ràtio d'apoptosi/necrosi, afavorint el remodelat vascular<sup>468</sup>. En resum, aquests estudis suggereixen que un increment dels nivells de miR-29b, induïts per l'exercici moderat en el nostre model, podrien tenir un efecte beneficiós a l'hora de prevenir el remodelat patològic de l'aorta.

En la figura 71 podem veure un esquema a mode de resum dels canvis tant estructurals com funcionals observats a l'aorta i els possibles mecanismes implicats:



**Figura 71. Esquema del remodelat vascular de l'aorta induït per l'exercici en el nostre model animal i els possibles mecanismes implicats.** CE: Cèl·lula endotelial, SMC: cèl·lula muscular llisa, NO: òxid nítric, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anió superòxid.

### 7.1.3.5. Remodelat estructural de l'artèria caròtida

En persones joves, les artèries centrals són generalment més elàstiques que les artèries perifèriques, però aquest gradient es pot revertir amb l'edat o la hipertensió. Concretament, la rigidesa de l'artèria caròtida comuna és 6 vegades més elevada en un subjecte normotens de 70 anys que en un subjecte de 20 anys<sup>469,470</sup>. A més, en pacients amb hipertensió i diabetis, l'artèria caròtida esdevé més rígida que les artèries femoral o radials, les quals en comparació esdevenen poc rígides amb l'edat o la hipertensió<sup>469,470</sup>. El gruix de la túnica íntima de la caròtida (cIMT) és un marcador àmpliament usat com a marcador d'aterosclerosi que es pot mesurar de manera simple i no invasiva mitjançant ultrasons en mode B. A més, el cIMT és un factor de predicció molt consistent per a futurs esdeveniments cerebrals i cardiovasculars<sup>471</sup>.

El paper de l'exercici sobre la progressió de l'aterosclerosi de la caròtida ha estat poc avaluat. L'estudi *Los Angeles Atherosclerosis Study* va demostrar una associació protectora entre l'activitat física de lleure i la progressió de cIMT en 500 subjectes d'edat mitjana lliures de patologia<sup>472</sup>. D'altra banda, l'estudi *The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study* va observar únicament una associació inversa entre l'activitat física dins de l'àmbit laboral i l'aterosclerosi subclínica, però l'activitat física de lleure i la pràctica d'activitats esportives no van tenir cap efecte sobre el cIMT<sup>473</sup>. Pel que fa referència als estudis d'intervenció, les dades mostren efectes positius o bé cap efecte de

la modificació de l'estil de vida amb la introducció d'una pauta d'exercici i la modificació del cIMT associat a l'edat<sup>474,475</sup>. Únicament tres estudis han analitzat els efectes nets de la implementació d'una pauta d'exercici i l'aterosclerosi de la caròtida, i han demostrat efectes beneficiosos de l'exercici<sup>474,476,477</sup>. La imprecisió a l'hora de valorar el volum d'activitat física a través de qüestionaris, els criteris arbitraris d'estratificació de l'activitat física així com les mostres petites i la quantificació del cIMT en diferents segments de l'artèria caròtida (comuna, interna, bifurcació) podrien jugar un paper determinant en la variabilitat de resultats obtinguts en els diferents estudis. A més, la variabilitat de sensibilitat i especificitat dels mètodes d'ultrasons utilitzats també podrien explicar la inconsistència observada.

Estudis recents poden manifestar que l'exercici extrem podria incrementar el risc d'aterosclerosi. L'anàlisi histològic de la caròtida esquerra en el nostre model animal no va mostrar canvis a nivell morfològic, però el percentatge de col·lagen de la túnica mitjana es va trobar incrementat significativament en el grup INT en comparació amb el grup SED. Els resultats indiquen un remodelat patològic de la túnica mitjana i suggereixen un increment de la rigidesa de l'artèria caròtida associat a la pràctica d'exercici a dosis elevades. L'exercici moderat no va induir cap canvi estructural d'aquest vas en el nostre model animal. A favor dels nostres resultats, un estudi de Möhlenkamp *et al.*<sup>478</sup> va observar una alta prevalença d'aterosclerosi a l'artèria caròtida i a les artèries perifèriques en corredors de marató que es relacionava amb un increment del risc cardiovascular mitjançant el *Framingham score*. En un estudi realitzat als participants de la marató de Boston en comparació amb subjectes control, es va observar una millora general del perfil cardiovascular en el grup d'esportistes però no es va observar una reducció de la magnitud d'aterosclerosi de la caròtida mesurada amb el cIMT<sup>479</sup>. Sembla ser doncs, que l'exercici d'elevada intensitat podria ser un accelerador de l'envelliment de l'artèria caròtida, promovent un remodelat patològic i incrementant la seva rigidesa amb un efecte similar a l'observat en l'aorta.

### **7.1.3.6. Remodelat estructural de vasos intramiocàrdics**

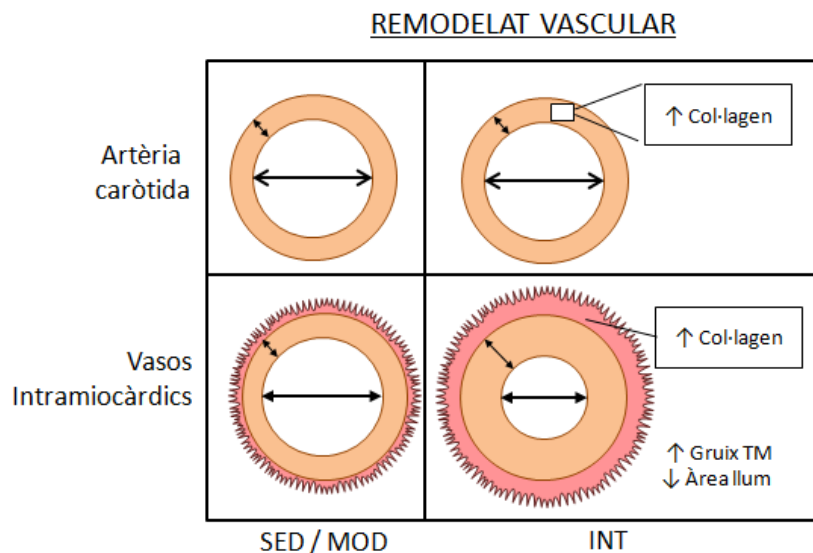
La rigidesa aòrtica associada a una disminució de la pressió aòrtica diastòlica pot limitar la correcta perfusió al miocardi<sup>480,481</sup>. En condicions fisiològiques, això es pot compensar amb un augment de la vasodilatació dels vasos coronaris<sup>482</sup>, però en presència d'aterosclerosi, una disminució de la perfusió pot conduir a una disminució de l'aportació d'oxigen al miocardi<sup>483-485</sup>. En un estudi experimental en gossos es va demostrar que una disminució de l'elasticitat aòrtica provocava un increment significatiu del risc d'isquèmia al subendocardi en presència d'estenosi coronària<sup>486</sup>. Diversos estudis clínics han observat una forta associació entre la rigidesa aòrtica i l'aterosclerosi d'artèries coronàries mitjançant angiografia coronària<sup>487,488,489</sup>.

El present treball va avaluar el remodelat estructural de vasos intramiocàrdics petits en resposta a l'exercici, ja que són de gran importància en el manteniment del flux sanguini i l'aportació d'oxigen tant a l'endocardi com a l'epicardi. Els resultats de l'anàlisi histològic en aquests vasos van mostrar una disminució de l'àrea de la llum vascular associada a un increment del gruix de la paret i a un augment de la fibrosi perivascular en el grup INT en comparació amb els grups SED i MOD. La reducció de la llum vascular i la presència de fibrosi perivascular d'artèries coronàries i d'arterioles del cor s'ha observat prèviament en pacients amb hipertensió i pacients amb insuficiència cardíaca<sup>490,491</sup>. A més, en estudis experimentals realitzats en ratolins genèticament obesos i resistents a l'insulina també s'ha observat un increment de la fibrosi al voltant d'arterioles i petites artèries del cor<sup>492</sup>, associats a un increment del risc de patir malaltia coronària. Paral·lelament, l'exercici intens en el nostre model animal va causar un increment de la rigidesa aòrtica (increment de fibrosi de la túnica mitjana i augment dels índexs de rigidesa  $\beta$  i Ep). Per tant, els nostres resultats suggereixen que l'exercici intens indueix un remodelat advers dels vasos intramiocàrdics, conduint a una reducció de la llum del vas que podria disminuir el flux sanguini al miocardi i per tant, incrementar el risc d'isquèmia<sup>480</sup>.

Un estudi poblacional recent, el *Rotterdam Study*, va estudiar a 1.757 subjectes i va mostrar que la presència de rigidesa aòrtica era un bon predictor d'esdeveniments cardiovasculars en individus adults sans<sup>444</sup>. Més tard, el mateix grup va observar que aquells subjectes amb una major rigidesa aòrtica, també presentaven una major proporció de calcificacions a les artèries coronàries<sup>493</sup>. L'avaluació directa de l'ateriosclerosi arterial coronària mitjançant l'índex CAC en estudis transversals, ha demostrat que un increment de l'activitat física està associada a una reducció de l'índex de CAC en la població general<sup>494,495</sup>. Tanmateix, alguns estudis recents han observat un increment de l'índex CAC en esportistes que practiquen exercici de resistència de forma extrema<sup>496</sup>. En un estudi recent, el 90% dels corredors de marató d'entre 50-70 anys van presentar plaques arterioscleròtiques en l'artèria caròtida i en artèries perifèriques<sup>478</sup>. L'estudi de Möhlenkamp *et al*<sup>284</sup> va observar una elevada prevalença de calcificacions intracoronàries a través de l'índex CAC en corredors habituals de marató sans de  $\geq 50$  anys, que a més, correlacionava amb el grau de fibrosi del VE. En un altre estudi on es va avaluar la prevalença de malaltia arterial coronària en 50 homes corredors de mitjana edat mitjançant angiografia coronària CT, es va detectar la presència d'ateriosclerosi coronària en una proporció alta de corredors (al voltant del 50%), tot i presentar un perfil de risc cardiovascular favorable<sup>497</sup>. Cal remarcar però que la implicació pronòstica de la calcificació coronària és incerta; alguns autors suggereixen que la calcificació coronària estabilitza les plaques d'ateriosclerosi<sup>498</sup>, mentre que altres suggereixen un major risc d'esdeveniments cardiovasculars associats amb aquest paràmetre<sup>284</sup>.

Aquestes observacions són de gran importància ja que podrien posar de manifest el potencial risc cardiovascular, sovint infravalorat, en els atletes de resistència d'alta intensitat. De forma destacable, el *Million Women Study*, un estudi prospectiu longitudinal recent on es van seguir a un milió de dones durant 9 anys, va demostrar que dosis lleugeres o moderades d'exercici físic van reduir el risc d'aparició de cardiopatia isquèmica o accident vascular cerebral, mentre que l'exercici intens diari va revertir aquest benefici i va incrementar el risc d'accidents isquèmics<sup>269</sup>. No obstant, aquests resultats encara no han estat reproduïts en altres estudis epidemiològics i, en general, la supervivència global dels atletes d'elit sembla ésser més prolongada que la població general<sup>499</sup>.

La figura 72 mostra un esquema a mode de resum dels canvis tant estructurals de l'artèria caròtida i dels vasos intramiocàrdics observats en el nostre model animal:



**Figura 72. Esquema del remodelat vascular de l'artèria caròtida i dels vasos intramiocàrdics observat en el nostre model animal i els possibles mecanismes implicats. TM: túnica mitjana.**

#### 7.1.4. Relació en forma de "U" entre la dosi d'exercici i el risc cardiovascular

L'anàlisi del remodelat vascular indica que mentre que l'exercici aeròbic moderat té efectes favorables en la funció vascular, l'exercici a dosis molt elevades podria tenir, de manera paradoxal, efectes oposats. En el nostre model animal crònic, l'exercici intens ha incrementat la rigidesa aòrtica i ha promogut un remodelat vascular patològic de l'aorta i de l'artèria caròtida. A més, una reducció de la llum dels vasos intramiocàrdics així com un increment de la fibrosi perivascular podrien contribuir a un increment del risc d'isquèmia associada a l'exercici intens. D'altra banda, l'exercici moderat ha millorat l'elasticitat aòrtica i la funció endotelial. En definitiva, els nostres resultats recolzen la idea

de que existeix una relació en forma de "U" entre la dosi d'exercici i el risc cardiovascular. Tanmateix, seran necessaris futurs estudis per tal de confirmar que els canvis cardiovasculars detectats en el nostre model d'exercici intens provoquin resultats clínicament importants en els humans.

## 7.2. PATOLOGIA VASCULAR I SAOS

### 7.2.1. Model animal crònic de SAOS: avantatges i limitacions

La majoria de models animals usats per a l'estudi de la SAOS es basen en simular únicament una de les característiques de la SAOS, la hipòxia intermitent crònica (IHC). En aquests cas, els animals són establats dins de càmeres que s'exposen a cicles de normoxia/hipòxia i que són controlades a través d'un ordinador. Depenent de l'espècie animal usada i el tipus d'estímul, els procediments aplicats varien des de 30s fins a 30min d'hipòxia i entre 2-120 obstruccions cada hora<sup>500-502</sup>. El model animal més habitualment usat es caracteritza per exposicions intermitents cròniques a un rang mínim de FiO<sub>2</sub> (fracció inspirada d'O<sub>2</sub>) del 6-10% de 30s a 1min, que resulta en una desaturació de la oxihemoglobina d'aproximadament el 60-80%. Aquests paràmetres experimentals serien l'equivalent de les formes més severes d'apnea del son en humans (IAH>30/h). Un dels desavantatges més importants d'aquests models és que no són capaços d'explorar les conseqüències d'algunes de les característiques de la SAOS com l'obstrucció de les vies aèries superiors, les oscil·lacions de pressió intratoràcica, els microdespertars i la hipercàpnia. Per tal de solventar aquestes mancances, s'han desenvolupat altres models més complexos que ofereixen una aproximació clínicament més realista per a l'estudi d'aquesta malaltia<sup>503-505</sup>. Aquests models permeten evitar les comorbiditats i usen procediments invasius per fer mesures sota condicions experimentals molt ben controlades, i són útils per l'estudi dels mecanismes fisiopatològics causats per la SAOS. Tanmateix, aquests models requereixen una manipulació de la via aèria dels animals i només permeten l'estudi dels efectes de la SAOS a curt termini.

El model crònic descrit en aquesta tesi<sup>372</sup> és un model no invasiu que es pot aplicar a l'exploració de diferents conseqüències de la SAOS: la HI, els esforços respiratoris i la hipercàpnia intermitent. Tanmateix, l'efecte de la fragmentació del son o microdespertars característics de la SAOS no s'han explorat en el present treball. El model presentat permet un estudi tipus dosi-resposta a través de la modificació de la freqüència i/o duració de les obstruccions, el número d'hores d'exposició per dia i la duració total de l'estudi. A més, també es podria adaptar per a l'estudi de només una de les conseqüències de la SAOS sense alterar els altres paràmetres. En conclusió, representa una eina útil per a la recerca dels mecanismes involucrats en les conseqüències a llarg termini de la SAOS. Com a possible limitació, s'ha de tenir en compte que en l'article

previ on es va presentar el model animal de SAOS descrit en aquesta tesi<sup>372</sup>, es van descriure disminucions en el pes dels animals així com elevacions dels nivells de corticosterona en plasma en aquells animals que s'havien familiaritzat al dispositiu utilitzat per a l'aplicació de les apnees obstructives, en comparació amb els animals control que no havien estat dins del dispositiu. Aquestes observacions indiquen un nivell d'estrès relacionat amb l'ús del dispositiu. No obstant, el fet de que els nivells de corticosterona al final de l'experiment van ser similars als nivells basals a l'inici de l'experiment suggereix que l'estrès associat a la restricció de moviment del dispositiu va ser, com a molt, de grau moderat i que no va augmentar al llarg de l'experiment. A més, l'ús d'un grup Sham que té en compte l'efecte de la restricció de moviment provocada pel dispositiu i l'estrès associat, permet analitzar els efectes induïts exclusivament per les apnees obstructives.

### 7.2.2. Canvis estructurals de l'aorta induïts per la SAOS

La HI es considera el component principal de la SAOS que predisposa a MCV i a aterosclerosi. Per exemple, en models murins d'HI crònics, la HI indueix aterosclerosi i juga un paper crucial en la morbiditats associades a la SAOS<sup>506</sup>. Els nostres resultats mostren un remodelat estructural de l'aorta toràctica descendent promogut per la SAOS, que es caracteritza per una hipertròfia (increment del gruix de la túnica mitjana) i una dilatació aòrtica (increment de l'àrea de la secció transversal i del diàmetre de la llum vascular). La dilatació de l'aorta s'ha relacionat clàssicament amb la PA. Segons la Llei de Laplace<sup>507</sup>, la tensió tangencial de la paret és directament proporcional a la pressió aplicada i al radi del vas i inversament proporcional al gruix de la paret. Per tant, la dilatació de l'aorta i hipertròfia de la paret observades en el nostre model animal, són el resultat d'una adaptació del vas per tal de compensar l'increment del *shear stress* durant la SAOS. En concordança amb els nostres resultats, un estudi recent en un model d'HI en ratolins mascle C57BL/6 va mostrar un increment del IMT de l'aorta toràctica sense observar canvis en el perímetre de la llum, suggerint un remodelat expansiu de l'aorta<sup>508</sup>. Els mateixos resultats van ser observats en un altre model d'HI en ratolí<sup>509</sup>. Contràriament, un model animal de fragmentació del son, una de les altres conseqüències de la SAOS, no va demostrar canvis ni en el gruix de la paret de l'aorta ni en el diàmetre de la seva llum, tot i observar una major desorganització de les làmines elàstiques i infiltrat inflamatori<sup>510</sup>. La quantificació de la fibrosi de la túnica mitjana en el nostre model no va mostrar diferències entre els grups SAOS i Sham ni es van observar diferències en els nivells de la proteïna col·lagen 1-3 a l'aorta. Mentre que en l'estudi de Sánchez-de-la-Torre *et al.*<sup>508</sup>, els canvis morfològics de l'aorta anaven acompanyats d'un increment del contingut de col·lagen després de 6 setmanes, en l'estudi de Dematteis M. *et al.*<sup>509</sup> després de 14 dies, l'aplicació d'HI no va causar alteracions del col·lagen. Sembla ser doncs que dins de les conseqüències de la SAOS, la HI jugaria un paper crucial en la

promoció del remodelat estructural de l'aorta i que, probablement, la duració de l'aplicació d'HI podria ser determinant en l'aparició de remodelat profibròtic a l'aorta.

Els estudis realitzats en la població general ofereixen resultats contraposats. La majoria d'aquests estudis investiguen l'associació entre la SAOS i el diàmetre de l'aorta<sup>511-514</sup>. Sis estudis transversals van observar una associació positiva entre el diàmetre de l'arrel aòrtica i els paràmetres de severitat de la SAOS (tant del IAH com de l'índex de saturació de l'oxigen)<sup>511-516</sup>. De forma similar, un estudi retrospectiu de 427 pacients (edat >45 anys) que s'havien sotmès a polisomnografia i a tomografia abdominal computaritzada, va revelar que la SAOS (IAH≥10) era un factor de risc independent per a la dilatació de l'aorta abdominal en homes ( $p=0.001$ )<sup>517</sup>. D'altra banda, dos estudis prospectius<sup>331,514</sup> i un estudi retrospectiu<sup>518</sup> no van corroborar les relacions anteriors. Cal tenir en compte però que en l'estudi de Meuleman *et al.*<sup>518</sup>, un 84% dels pacients amb SAOS rebien tractament amb CPAP, i segurament aquest fet va diluir els efectes de la SAOS sobre el diàmetre de l'arrel aòrtica. A més, l'estudi de Lee *et al.*<sup>331</sup>, tot i no mostrar una associació independent entre el diàmetre de l'aorta toràctica i l'IAH en pacients que havien patit un infart agut de miocardi (IAM), si els pacients es classificaven segons l'IAH, aquells pacients amb SAOS severa (IAH>30) presentaven un diàmetre aòrtic més gran ( $p=0.048$ ). En global, l'anàlisi dels resultats anteriors suggereix que l'impacte advers de la SAOS sobre la aorta només seria evident a partir d'una certa severitat, probablement molt per sobre del llindar a partir del qual es realitza el diagnòstic de la SAOS (IAH=5).

Així doncs, la SAOS, a través de diversos mecanismes, podria promoure el remodelat de l'aorta, la seva dilatació<sup>519</sup> i en conseqüència, augmentar el risc de dissecció i ruptura<sup>520</sup>. La recerca de l'impacte de la SAOS sobre la malaltia aòrtica s'ha centrat majoritàriament en l'estudi de pacients amb la síndrome de Marfan<sup>320,521</sup>. Aquesta síndrome consisteix en un desordre genètic del teixit connectiu associat a anormalitats craniofacials i a un increment de la obstrucció de les vies aèries superiors. La dilatació de l'aorta i la dissecció i ruptura associada són la causa principal de morbiditat i mortalitat en els pacients amb la síndrome de Marfan<sup>522</sup>. S'ha confirmat una alta prevalença de SAOS entre els pacients amb síndrome de Marfan i s'ha observat una correlació moderada entre l'IAH i el diàmetre màxim de l'aorta en aquests pacients<sup>523</sup>. Un estudi longitudinal va mostrar una major prevalença de ruptura de l'aorta únicament en aquells pacients amb SAOS i una correlació dels esdeveniments aòrtics amb l'IAH<sup>524</sup>. A més, la presència de SAOS severa és també més prevalent en altres formes de malaltia aòrtica. Estudis com per exemple el de Sampol *et al.*<sup>525</sup> han documentat la presència d'índexs IAH elevats en pacients amb dissecció d'aorta toràctica en comparació amb controls aparellats per edat, sexe i índex de massa corporal (IMC) ( $p=0.032$ ). Altres estudis demostren en pacients



amb aneurismes d'aorta toràctica i d'aorta abdominal, una major prevalença de SAOS severa<sup>526</sup>.

En base a la literatura científica, serien necessaris estudis amb mostres més grans i representatives de pacients amb SAOS severa (IAH>30/h) per tal d'investigar un risc potencialment elevat de malaltia aòrtica en aquest grup de pacients i confirmar els canvis detectats en el nostre model. També serien necessaris estudis controlats i aleatoritzats per tal d'establir una relació causal entre la SAOS i la malaltia aòrtica. A més, estudis longitudinals que analitzin efectes a llarg termini de la SAOS (p.ex.: esdeveniments aòrtics) donarien una evidència clínicament rellevant a aquesta associació.

### 7.2.3. Mecanismes potencials per l'associació entre SAOS i remodelat aòrtic

Els mecanismes subjacents a través dels quals la SAOS pot promoure el remodelat patològic de l'aorta no han estat del tot investigats. Alguns estudis han descrit diversos mecanismes que inclouen canvis en la pressió intratoràctica associats a un augment del *shear stress* a la paret de l'aorta<sup>523,524,512,511</sup>, HI associada a un augment de l'estrès oxidatiu i activació del sistema simpàtic<sup>512,511,527</sup> i microdespertars associats a una activació del sistema simpàtic<sup>513,528,529,530</sup>.

Els episodis d'apnea repetitius en la SAOS resulten en esforços inspiratoris en contra d'una via obstruïda, causant oscil·lacions negatives de la pressió intratoràctica. Aquestes forces promouen un estrès mecànic del VE i de l'aorta<sup>531,322</sup>, que pot afavorir el remodelat estructural de la seva paret i promoure la seva dilatació. En concordança amb això, un estudi en pacients que es sotmetien a cateterisme cardíac va demostrar que durant la simulació d'apnea/hipopnea obstructiva, es produïa un increment de la pressió transmural de l'aorta<sup>531</sup>.

En la SAOS, la restricció del flux aeri pot durar fins a 1 min. Com a conseqüència, els nivells d'oxigen en sang disminueixen i els nivells de diòxid de carboni incrementen. Cada l'episodi apneic s'acompanya d'increments transitoris de la pressió sanguínia per una activació del sistema simpàtic i una alliberació de catecolamines<sup>532</sup>. En el nostre model animal, la SAOS ha promogut un increment local dels nivells de proteïna ECA-1 a l'aorta en comparació amb el grup Sham. L'activació del SRAA és una via de senyalització molt coneguda implicada en el control de la pressió sanguínia<sup>533</sup>. La renina és l'encarregada de convertir l'angiotensinogen a angiotensina-I (Ang-I), la qual és convertida a Ang-II a través de l'enzim ECA. L'efecte final de l'Ang-II, mitjançant la unió al seu receptor (AT1) és la vasoconstricció i, en conseqüència, l'increment de la pressió sanguínia. A més, l'Ang-II és un estímul molt important del factor de creixement vascular de l'endoteli (VEGF), una citocina que contribueix a la proliferació cel·lular afavorint el procés

d'aterosclerosi<sup>534</sup>. S'ha proposat que la SAOS contribueix a la hipertensió a través de l'activació del SRAA<sup>535</sup>. Un estudi experimental en rata<sup>536</sup> va demostrar que 35 dies consecutius d'episodis recorrents d'hipòxia (30 s, 7 h/dia) van promoure increments de 8-13 mmHg de la pressió sanguínia mitjana diürna i que el bloqueig dels receptors AT1 amb un antagonista (losartan) va eliminar aquesta resposta. De forma similar, un estudi amb pacients amb SAOS va demostrar un increment dels nivells d'Ang-II i VEGF en sèrum i una major expressió de ARNm de VEGF als leucòcits. El tractament amb un antagonista de l'AT-1 (olmesartan) va causar una disminució dels nivells de ARNm de VEGF i de l'expressió de proteïna en aquests pacients, mentre que el tractament amb Ang-II va produir un increment de l'expressió de VEGF<sup>537</sup>. A més, la resposta vasoconstrictora a l'Ang-II s'ha trobat incrementada en pacients amb SAOS<sup>538</sup>, suggerint un paper important del SRAA en la promoció de la hipertensió secundària observada en aproximadament el 50% dels pacients amb SAOS<sup>539</sup>.

La hipòxia s'associa a una producció de ROS, la qual augmenta les citocines pro-inflamatòries i promou la producció de molècules d'adhesió en les CEs i leucòcits, afavorint el procés l'aterosclerosi<sup>322,506</sup>. En pacients amb SAOS, la severitat de la SAOS es troba associada de forma independent a l'estrès oxidatiu<sup>540</sup>. El mitocondri és la font d'anions superòxid més important<sup>541</sup>, però també existeixen altres fonts de ROS que inclouen enzims com la xantina oxidasa, l'eNOS i la NADPH<sup>542</sup>. L'increment de la producció d'anions superòxid (DHE) a l'aorta en el nostre model, suggereix un increment local de l'estrès oxidatiu induït per la SAOS. Paral·lelament, hem observat increments significatius dels nivells de proteïna de dues de les subunitats de la NADPH oxidasa (gp91<sup>phox</sup> i p47<sup>phox</sup>), i una disminució dels nivells d'eNOS en l'aorta dels animals sotmesos a apnees. D'acord amb els nostres resultats, s'ha observat que els pacients amb SAOS presenten una producció intracel·lular elevada de ROS en els leucòcits a través de via de la NADPH oxidasa, en comparació amb individus sans<sup>543</sup> i controls amb una altra patologia<sup>544</sup>. Jelic *et al.*<sup>545</sup> van realitzar experiments *in vitro* amb CEs de 32 pacients amb SAOS i 15 controls, i van observar una disminució de l'expressió de l'eNOS i una sobreexpressió del marcador d'estrès oxidatiu nitrotirosina en els pacients amb SAOS. Altres marcadors d'estrès oxidatiu, com la peroxidació lipídica, també s'han trobat incrementats en pacients amb SAOS<sup>542,546</sup>. A més, s'ha demostrat que els pacients amb SAOS tenen una capacitat antioxidant atenuada, seguint una relació lineal positiva amb la severitat de SAOS i amb l'IAH<sup>547</sup>.

Entre altres efectes, l'Ang-II pot contribuir a la producció de superòxid a través de l'activació de la NADPH oxidasa<sup>548</sup> i a través de la producció mitocondrial de ROS<sup>549</sup>. Quan la generació de ROS excedeix la capacitat antioxidant de l'organisme es produeix estrès oxidatiu que pot danyar les cèl·lules i teixits causant disfunció endotelial. En

conseqüència, la biodisponibilitat del NO disminueix i la capacitat vasodilatadora dels vasos es troba compromesa. La dilatació modulada pel flux a l'artèria braquial (FMD), la qual es considera el test estàndard no invasiu per avaluar la funció endotelial, es troba reduïda en els pacients amb SAOS<sup>550</sup>. Entre els pacients adults ( $\geq 68$  anys) amb SAOS que van participar al *Sleep Heart Health/Cardiovascular Health Study*, la FMD es va trobar reduïda després d'ajustar-se per l'IMC i per comorbiditats cardiovasculars<sup>551</sup>. En un altre estudi, la SAOS va causar disfunció endotelial de l'artèria braquial en un grau similar a la diabetis tipus 2<sup>552</sup>. De manera contrària, un altre estudi observacional no va observar aquesta associació<sup>553</sup>. Tanmateix, cal remarcar que la majoria dels pacients d'aquest estudi (63%) presentaven una forma de SAOS lleu (IAH=5-15) i, en conseqüència, la hipòxia va tenir un paper menys significatiu. En el nostre model, una baixa producció d'NO (baixa expressió d'eNOS), un increment de l'estrès oxidatiu (major producció de superòxid i major expressió de les subunitats de la NADPH oxidasa) i un augment de la vasoconstricció (alta expressió d'ECA-1) podrien contribuir a la disfunció endotelial pròpia dels pacients amb SAOS.

### **7.2.4. Potencial efecte protector del remodelat aòrtic per les CMMs**

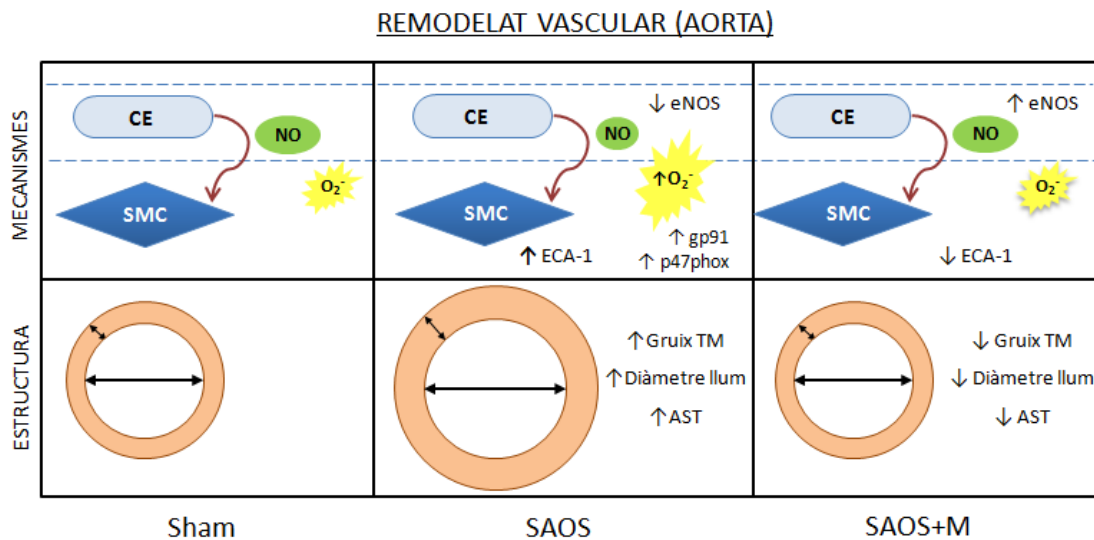
Determinar si la malaltia aòrtica és causada pels efectes aguts o crònics de la SAOS podria ser de gran importància per a futures implicacions terapèutiques. La efectivitat del tractament amb CPAP per a la prevenció primària i secundària de malaltia aòrtica en els pacients amb SAOS seria de gran importància. Tanmateix, l'ús del CPAP sovint suposa un repte clínic degut a que l'adherència al tractament en pacients amb SAOS és del 30-60%<sup>554</sup>.

Les CMMs són cèl·lules mare multipotents que presenten diferents efectes: antifibròtics, immunomoduladors, antiapoptòtics i proangiogènics així com efectes paracrins<sup>347-349</sup>. Estudis recents tant experimentals com amb pacients indiquen que les cèl·lules mare adultes realitzen un paper d'homeòstasi important en els processos d'inflamació i disfunció endotelial associats a la SAOS<sup>354,355</sup>. Així doncs, la teràpia amb CMMs podria tenir un paper protector a través de la modulació d'aquestes respostes.

S'ha demostrat que la IHC mobilitza les CMMs de la medul·la òssia cap a la sang perifèrica en rates<sup>555</sup>. En un altre estudi de Carreras *et al.*<sup>354</sup>, on es va utilitzar un model agut d'obstruccions aèries, el sèrum d'aquestes rates va ser capaç d'activar les CMMs *in vitro*, suggerint que la SAOS indueix l'alliberament de certes proteïnes quimiotàctiques que promouen la mobilització de les CMM cap al teixit danyat. A més, els mateixos autors van demostrar que les CMMs desencadenaven una resposta antiinflamatòria primerenca en aquelles rates sotmeses a apnees obstructives<sup>556</sup>. Tanmateix els possibles efectes protectors de les CMMs en aquesta patologia encara no han estat del tot investigats. Amb

el nostre model animal de SAOS crònic hem demostrat per primera vegada que l'administració de CMMs podria tenir un paper protector i d'homeòstasi en el remodelat vascular associat a la SAOS. Aquesta millora es tradueix en una atenuació dels canvis morfològics induïts per la SAOS (disminució de la hipertròfia de la túnica mitjana i de la dilatació de la llum vascular), una disminució de la producció d'anions superòxid i una normalització dels nivells de proteïna eNOS i ECA-1 a l'aorta, en comparació amb el grup Sham. Recentment s'han publicat diversos estudis on es fa ús de les CMMs com a tractament per a l'aneurisma d'aorta (AA)<sup>557-561</sup>. En consonància amb els nostres resultats, l'administració intravenosa de CMMs durant 4 setmanes en un model d'AA en ratolí per infusió d'Ang-II, va reduir la incidència d'AA en comparació amb el grup control i va atenuar la progressió i expansió de la dilatació de l'aorta<sup>561</sup>. A més, la infusió de CMMs va suprimir l'activitat enzimàtica de la MMP-2 i MMP-9 i va disminuir l'expressió proteica de citocines inflamatòries (IL-1 $\beta$ , IL-6 i proteïna quimiotàctica de monòcits-1, MCP-1) de l'aorta. Les CMMs també van inhibir la degradació d'elastina, probablement a causa de la sobreexpressió proteica de la TIMP-2. De forma similar, en un model murí de xenotrasplantament, l'administració endovascular de CMMs humanes va reduir significativament l'expansió de la dilatació dels vasos, juntament amb una reducció de l'activitat de MMP-9 i a un increment dels nivells TIMP-1<sup>558</sup>. Els mateixos resultats es van observar en un model d'AA, on la infusió intravenosa de CMMs a ratolins ApoE-/- va causar una disminució del diàmetre aòrtic, una menor activitat MMP i un menor infiltrat inflamatori de macròfags en comparació amb animals control<sup>560</sup>. En el nostre model, les CMMs tenen un efecte favorable disminuint la dilatació de l'aorta i, aquest efecte sembla estar modulats per una disminució de l'estrès oxidatiu i de l'activació del SRAA.

En la figura 73 s'observa un esquema a mode de resum del remodelat vascular de l'aorta induït per la SAOS i els possibles mecanismes associats:



**Figura 73. Esquema del remodelat vascular de l'aorta observat induït per la SAOS en el nostre model animal i els possibles mecanismes implicats.** CE: Cèl·lula endotelial, SMC: cèl·lula muscular llisa, NO: òxid nítric, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anió superòxid, TM: túnica mitjana, AST: àrea de la secció transversal.

### 7.2.5. Futurs reptes de la teràpia amb CMMs

L'eficàcia de les CMMs pel tractament de diverses patologies tot i ser molt prometedora, posa a la llum diverses limitacions que encara no han estat resoltes. En primer lloc, la majoria d'aquests estudis estan realitzats en animals i la seva eficàcia encara ha de ser de provada en estudis clínics controlats amb pacients. A més, no es coneix quin és el nombre de cèl·lules, la freqüència d'administració i la duració adequada pel tipus de tractament requerit. Cal remarcar que les vies d'administració dels estudis publicats són diferents: l'administració intravenosa és un procediment poc invasiu i simple, però l'habilitat de les CMMs per arribar a l'òrgan diana és inferior que la infusió de les CMMs directament al teixit<sup>562</sup>. En tercer lloc, les cèl·lules injectades tenen la capacitat de diferenciar-se a diferents tipus cel·lulars dins de la paret aòrtica (adipòcits, osteòcits,...) que poden promoure efectes no desitjables com el dipòsit de lípids o calcificacions. A més, l'aïllament i expansió de les CMMs resulta cada vegada més difícil amb l'edat. Així doncs és molt important posar esforços en la recerca de teràpies amb CMMs al·logèniques, i no només autòlogues. Finalment, per tal de confirmar i replicar els resultats observats, l'ús de models animals grans seria necessari.

Els nostres resultats suggereixen que la detecció primerenca dels pacients amb SAOS i la seva intervenció terapèutica podria ser clau per normalitzar els processos de remodelat vascular patològic induït per la SAOS, evitant en conseqüència morbiditats associades. Recentment, un anàlisi de perfil proteòmic de diversos factors tròfics obtinguts a partir del medi condicionat de CMMs mitjançant espectrofotometria de masses i *microarrays*, va identificar diverses senyals que jugarien un paper important en l'efecte paracrí de les

CMMs, com per exemple el TGF- $\beta$ , l'IGF-1, l'EGF (*epidermal growth factor*), el FGF (*fibroblast growth factor*), interleuquines, MMPs i TIMPs<sup>563</sup>. Tanmateix, l'estudi dels mecanismes moleculars a través dels quals les CMMs exerceixen els seus efectes protectors sobre el remodelat vascular associat a la SAOS requereix més investigació.

## **ESTUDI 2**

En el segon estudi d'aquesta tesi s'ha investigat l'exercici de resistència d'alta intensitat i la SAOS com a promotors de subtrat arritmogènic auricular en dos models animals. També s'ha avaluat la prevenció del subtrat arritmogènic auricular mitjançant dos tractaments diferents.

Per una banda, s'ha demostrat que l'exercici d'alta intensitat promou la fibrogènesi auricular. El sildenafil ha previngut el desenvolupament de fibrosi únicament en la cavitat esquerra auricular, suggerint una possible acció directa sobre el miocardi. El TGF- $\beta$  sembla jugar un paper clau en l'efecte protector del sildenafil.

De manera similar, la SAOS ha promogut el desenvolupament de fibrosi auricular. El SRAA, la MMP-2 i l'acció proinflamatòria de la SAOS podrien modular la fibrosi a les aurícules. L'ús de CMMs per a la prevenció del remodelat auricular ha resultat ser efectiva, normalitzant l'expressió dels diferents marcadors profibròtics i disminuint els nivells d'inflamació sistèmica.

## **7.3. PATOLOGIA CARDÍACA I EXERCICI INTENS**

### **7.3.1. Remodelat cardíac associat a l'exercici intens**

#### **7.3.1.1. Hipertrofia cardíaca associada a l'exercici intens**

L'exercici intens va causar hipertrofia cardíaca mesurada a partir del pes del cor normalitzat pel pes corporal. A més, l'exercici intens va promoure un augment significatiu dels gruixos de la paret lliure del VE i del VD així com del SIV. Els nostres resultats són consistents amb resultats previs publicats pel nostre grup, els quals han demostrat una major hipertrofia cardíaca acompanyada d'una major dilatació del VE en els animals sotmesos a exercici intens<sup>279,564</sup>. Existeix una evidència científica molt consistent a l'hora de demostrar la presència d'hipertrofia del VE en atletes de resistència<sup>565,89</sup>. De manera similar, la hipertrofia excèntrica del VD també s'ha observat en atletes de resistència mitjançant ecocardiografia i ressonància magnètica cardíaca<sup>202</sup>.

### 7.3.1.2. Remodelat profibròtic auricular associat a l'exercici intens

El cor pateix una sèrie d'adaptacions per fer front als canvis hemodinàmics provocats per l'exercici que alteren les seves condicions de càrrega. Aquests canvis inclouen adaptacions dels miòcits, però també d'altres tipus cel·lulars com les VSMCs, les CEs i els fibroblasts cardíacs. Aquests últims són els responsables de la síntesi de la MEC, augmentant la producció de col·lagen en resposta a una lesió. Els nostres resultats demostren que l'exercici intens va incrementar de manera significativa el contingut de col·lagen en ambdues aurícules, en comparació amb el grup sedentari. Diversos estudis experimentals han demostrat a través de l'anàlisi histològic que episodis aguts d'exercici intens provoquen un dany tissular al miocardi i inicien un procés de remodelat associat a canvis bioquímics i funcionals, com una elevació de marcadors de fibrosi i de necrosi, immediatament després de l'exercici<sup>566,567</sup>. En atletes de resistència, la presència de fibrosi miocàrdica al VE mesurada a través de ressonància magnètica amb contrast de gadolini (LGE) s'ha confirmat en diversos estudis realitzats a Austràlia (presència de fibrosi en el 13% dels atletes) i a Anglaterra (50% dels atletes)<sup>568</sup>. A més, s'ha observat que la prevalença de LGE incrementa de manera proporcional amb els anys d'entrenament a nivell competitiu i amb el número de maratons completades<sup>284</sup>. Tot i que estudis experimentals suggereixen una afectació més important en el VD<sup>279</sup>, aquestes troballes no han pogut ésser confirmades en humans.

D'altra banda, les característiques pròpies de les aurícules, amb la presència d'una paret més fina en comparació amb els ventricles, les fan més propenses a patir un remodelat fibròtic i, en conseqüència, a desenvolupar un substrat per a FA. Existeix una evidència científica cada vegada més gran que demostra que els atletes que practiquen esports de resistència a llarg termini tenen una prevalença més elevada de patir FA en comparació amb la població general<sup>128-130,270,569</sup>. En base a l'evidència acumulada, recentment una revisió sobre la FA i l'exercici de resistència d'alta intensitat a nivell competitiu<sup>570</sup> va proposar la definició d'una nova síndrome: la 'PAFIYAMA' (*paroxysmal AF in young and middle-aged athletes*). El perfil clínic típic de la FA associada a l'exercici de resistència són homes joves o de mitjana edat sans (≈40-50 anys) amb una història de pràctica regular d'esports de resistència com córrer, el ciclisme o l'esquí de fons (p.ex.: ≥1 h/dia quasi cada dia de la setmana a una intensitat del ≥60% del VO<sub>2</sub> max o ≥8 METS) com a mínim durant els últims 6 mesos. En general la FA en aquests subjectes és de tipus paroxística i incrementa progressivament en la seva duració al llarg del temps. Els afectats solen presentar les característiques típiques del 'cor d'atleta', amb una PA normal en repòs i solen ser persones no fumadores ni diabètiques. Les condicions úniques d'aquests pacients en comparació amb els pacients clàssics de FA augmenta la

necessitat d'explorar la seva fisiopatologia i posa èmfasi en el diagnòstic diferencial i en una supervisió mèdica amb un abordatge més personalitzat.

Les causes de FA en els atletes encara no són ben conegudes. La fibrosi auricular és un mecanisme central en el desenvolupament de FA. El nostre treball confirma troballes prèvies que apuntaven a un increment de fibrosi auricular induïda per l'exercici de molt elevada intensitat<sup>276</sup>. Tanmateix, cal remarcar que aquest, aproximadament un 60%, era d'una magnitud menor a la d'altres causes de FA. Per exemple en models canins d'insuficiència cardíaca associada a FA, s'han observat increments d'entre un 300% a un 1500% del percentatge de fibrosi a les aurícules en comparació amb els animals control<sup>571,572</sup>. En humans però, no existeixen estudis on s'hagi quantificat la fibrosi a les aurícules en esportistes d'elit. D'Ascenzi *et al.*<sup>573,574</sup> van avaluar la fibrosi de l'AE de manera indirecta mitjançant ecocardiografia i ressonància magnètica cardíaca (cMRI), i van concloure que la distensió miocàrdica o *strain* (relacionada amb la presència de fibrosi) a les aurícules va ser normal o fins i tot inferior en els atletes en comparació amb els controls.

L'aparició de fibrosi auricular no és l'únic mecanisme que incrementa potencialment el risc de desenvolupar FA. Existeixen altres mecanismes que inclouen adaptacions de les aurícules a nivell elèctric, amb alteracions de les propietats de les corrents iòniques; alteracions a nivell autonòmic, amb hipertonia vagal; i alteracions a nivell estructural, amb una major dilatació de les cavitats auriculars. Tots aquests factors faciliten la formació de reentrades i afavoreixen el desenvolupament i el manteniment de la FA. Resultats previs del nostre grup van mostrar que, a més d'un increment del percentatge del col·lagen auricular, una major dilatació auricular i un increment del to vagal participen potencialment en el desenvolupament de FA induïda per l'exercici<sup>359</sup>. En línia amb aquests resultats, un estudi recent en ratolins també va demostrar que 6 setmanes d'exercici intens tant nedant com en cinta rodant van ser suficients per incrementar la fibrosi auricular, la inflamació i el to vagal i van promoure un increment de la vulnerabilitat a patir FA<sup>277</sup>.

### **7.3.1.3. Mecanismes promotors de remodelat profibròtic auricular**

De manera hipotètica, la sobrecàrrega de volum sostinguda causada per l'exercici de resistència intens provoca un increment de l'estrès oxidatiu i elevacions sostingudes de catecolamines. Com a conseqüència, es produeixen lesions microscòpiques al miocardi que evolucionen a fibrosi dispersa, promovent l'aparició d'un substrat arritmogènic que predisposa a patir FA. Els resultats del nostre estudi mostren que l'exercici intens promou un increment de l'expressió d'ARNm tant d'ECA com de TGF- $\beta$ 1 a ambdues aurícules. Està demostrat que durant l'exercici de resistència es produeixen canvis neurohormonals



caracteritzats per una activació del SRAA i un increment de l'alliberació de catecolamines<sup>575</sup>. El SRAA és un mediador molt important en el remodelat cardíac i en la promoció del substrat de FA: l'Ang-II, sintetitzada per l'ECA, actua indirectament a través del TGF- $\beta$ 1 promovent la transformació dels fibroblastes a miofibroblastes, afavorint així la síntesi de col·lagen. Estudis *in vitro* en fibroblasts cardíacs han demostrat que l'Ang-II promou la síntesi de MEC a través de l'expressió de TGF- $\beta$ 1<sup>576-578</sup>. La seva activació mitjançant la unió als seu receptors de membrana (TGF $\beta$ RI-TGF $\beta$ RII) resulta en l'activació d'una sèrie de cascades de senyals intracel·lulars que condueixen a la translocació nuclear de les proteïnes activades Smad, les quals modulen l'expressió de gens relacionats amb la fibrosi. A més, diversos estudis experimentals han demostrat la importància del TGF- $\beta$ 1 en el remodelat auricular. Per exemple, en un model caní d'ICC, la inhibició de TGF- $\beta$ 1 va ser capaç de prevenir la fibrosi auricular, anormalitats en la conducció elèctrica i la susceptibilitat a desenvolupar FA<sup>134</sup>. No obstant, l'evidència del paper del TGF- $\beta$ 1 en pacients amb FA encara no ha estat confirmada tot i que un estudi recent sí que va observar nivells més elevats de TGF- $\beta$ 1 en mostres d'aurícula de pacients amb FA<sup>579</sup>. En conclusió, els resultats del present estudi suggereixen que l'exercici intens indueix una sobrecàrrega mecànica del cor que es tradueix en un remodelat estructural amb un increment del percentatge de col·lagen a les aurícules probablement modulats per l'alliberació de neurohormones com l'Ang-II i de citocines com el TGF- $\beta$ 1, afavorint la creació d'un substrat per l'aparició de FA.

### 7.3.2. Ús del sildenafil per a la prevenció del remodelat cardíac

#### 7.3.2.1. Efectivitat del tractament amb sildenafil

En un estudi previ del nostre grup, es va observar que el contingut de col·lagen a les aurícules es mantenia elevat després d'un període de desentrenament de 8 setmanes<sup>359</sup>. Per aquest motiu, evitar l'inici del procés fibròtic podria ser una eina molt important com a teràpia preventiva per a l'aparició d'arítmies en els esportistes d'elit. La nostra hipòtesi inicial es va basar en el potencial efecte del sildenafil en reduir la PAP durant l'exercici així com dels seus efectes directes protectors sobre el miocardi, per tal de prevenir l'aparició del substrat arritmogènic auricular associat a l'exercici intens. La dosi de sildenafil es va seleccionar tenint en compte estudis toxicològics en rates realitzats en la fase preclínica del desenvolupament del medicament<sup>580</sup>. Basant-nos en estudis experimentals en models d'hipertensió arterial en rata<sup>581,582</sup>, es va escollir la dosi més baixa efectiva (25mg/kg). L'increment de la concentració de GMPc (pg/ml) en plasma observat en els animals tractats amb sildenafil tant a les 8 setmanes (Sed: 0.13 $\pm$ 0.09; Sed+SIL: 1.4 $\pm$ 0.21; Ex: 1 $\pm$ 0.2; Ex+SIL:39.7 $\pm$ 4.58), com a les 16 setmanes (Sed: 2.4 $\pm$ 0.70;

Sed+SIL:  $15.8 \pm 3.09$ ; Ex:  $1.2 \pm 0.95$ ; Ex+SIL:  $5.9 \pm 2.65$ ), va indicar la correcta inhibició de la hidròlisi del GMPc pel sildenafil i per tant l'efectivitat del tractament administrat.

### 7.3.2.2. Ús del sildenafil per prevenir la hipertròfia cardíaca

S'ha demostrat que l'increment de GMPc al miocardi pel sildenafil suprimeix certes cascades de senyalització cel·lular involucrades en la hipertròfia maladaptativa i severa i està associat a l'activació de la PKG i algunes de les seves dianes, com la calcineurina-NFAT. Diversos estudis experimentals han demostrat que l'administració de sildenafil minimitza la hipertròfia i disfunció del VE i redueix el remodelat del VE causat per l'infart de miocardi<sup>54,583</sup>. L'administració crònica de sildenafil també ha demostrat revertir i prevenir la hipertròfia cardíaca total i del VE en models de sobrecàrrega de pressió per constricció de l'aorta toràcica<sup>54</sup> o per regurgitació mitral crònica<sup>584</sup>. En el nostre estudi, el tractament amb sildenafil no va reduir la hipertròfia cardíaca total (pes del cor normalitzat pel pes corporal) ni l'augment dels gruixos ventriculars promoguts per l'exercici intens. L'augment del volum de les cavitats cardíques i del gruix de les parets miocàrdiques són característiques de l'adaptació fisiològica del cor en els esportistes (cor d'atleta)<sup>89</sup>. Es creu que les vies de senyalització cel·lulars activades per aquest tipus d'hipertròfia en comparació amb les activades per la hipertròfia patològica són diferents. Aquest fet podria explicar que el sildenafil no hagi tingut cap efecte sobre la hipertròfia cardíaca associada a l'exercici intens en el nostre model animal.

### 7.3.2.3. Ús del sildenafil per prevenir el remodelat profibròtic auricular

En el present estudi, el sildenafil va prevenir l'aparició de fibrosi associada a l'exercici intens únicament en l'AE. Aquests resultats coincideixen amb diversos estudis experimentals on s'ha demostrat un efecte antifibròtic del sildenafil en models animals de sobrecàrrega de pressió del VE<sup>54,585</sup> així com en models d'hipertròfia i fibrosi cardíaca per infusió d'Ang-II<sup>586</sup>.

L'efecte antifibròtic del sildenafil observat a l'AE en el grup Ex+SIL es va associar a una reducció de l'expressió d'ARNm de TGF- $\beta$ 1. Tanmateix, tot i que el sildenafil va prevenir la fibrosi a l'AE, no va reduir l'expressió de l'ECA en aquesta cavitat, suggerint que el marcador ECA no és suficient per mantenir la fibrosi auricular induïda per l'exercici intens. A l'AD, el tractament amb sildenafil no va produir canvis en l'expressió dels marcadors TGF- $\beta$ 1 i ECA en el grup Ex+SIL. El TGF- $\beta$ 1 té un paper molt important en promoure la transformació dels fibroblasts cardíacs a miofibroblasts. Estudis previs han demostrat que la via de senyalització del GMPc/PKG influeix de manera negativa en l'activació del procés de fibrosi cardíaca, interactuant directament sobre la cascada de senyalització intracel·lular del TGF- $\beta$ 1<sup>587</sup>. Per exemple, en un estudi en un model murí de constricció

aòrtica toràcica (TAC)<sup>585</sup>, la inhibició crònica de GMPc durant 4 setmanes amb sildenafil va resultar en una millora de la funció cardíaca i una reducció de la fibrosi cardíaca. Aquest estudi també va demostrar que la inhibició de la proliferació i transformació dels fibroblasts cardíacs així com de la producció de col·lagen es trobava modulada pel TGF- $\beta$ 1 tant *in vitro* com *in vivo*<sup>585</sup>. Estudis anteriors ja havien identificat al GMPc com un regulador negatiu de la diferenciació dels fibroblasts en cultiu<sup>587,588</sup>. Segons aquests estudis, el GMPc interactua amb la via del TGF- $\beta$ 1 bloquejant la translocació nuclear de la proteïna Smad3 a través de la fosforil·lació per la PKG de la Ser309 i Thr388, inhibint els efectes profibròtics del TGF- $\beta$ 1<sup>589</sup>. Al marge dels estudis citats, existeix poca informació sobre l'impacte de la inhibició de la PDE5 en la progressió de la fibrosi cardíaca, tot i que en línia amb els nostres resultats, s'hipotetitza que la via de senyalització del TGF- $\beta$ 1 podria participar en els efectes antifibròtics dels IPDE5s.

#### 7.3.2.4. Mecanismes protectors dels sildenafil sobre les MCVs

Cada vegada hi ha més evidència científica dels efectes beneficiosos dels IPDE5s sobre diverses MCV com per exemple en el dany miocàrdic per isquèmia/reperfusió, en l'infart de miocardi, en l'hipertrofia cardíaca, en la miocardiopatia, en l'ictus i en la insuficiència cardíaca<sup>53,589-592</sup>. Contràriament a l'hipòtesi inicial, la qual esperava observar una millora principalment de les cavitats dretes del cor associada a una reducció de la PAP amb el sildenafil, els resultats del nostre treball confirmen l'existència d'una resposta diferencial del sildenafil amb un efecte beneficiós específic sobre la cavitat esquerra auricular, prevenint l'aparició de fibrosi. Una de les principals limitacions en el present estudi és la manca d'un estudi hemodinàmic *in vivo* amb la finalitat de valorar la pressió tant pulmonar com arterial dels animals. A més, un estudi per telemetria permetria mesurar la pressió del VD durant l'exercici, i d'aquesta estimar indirectament l'increment de la PAP. Estudis amb dosis més elevades de sildenafil seran necessaris per tal d'analitzar si la resposta diferencial entre les dues cavitats auriculars es manté o bé existeix un efecte sobre l'AD a dosis més altes de sildenafil. Un estudi electrofisiològic i d'inducibilitat d'arítmies *in vivo* amb l'objectiu de valorar si la presència de fibrosi observada a les aurícules va acompanyada d'un increment de la susceptibilitat a desenvolupar FA seria també de gran importància per a estudis futurs.

Es creu que els mecanismes a través dels quals els IPDE5s milloren la disfunció ventricular venen mediat principalment per l'activació de la PKA<sup>57</sup>. En condicions normals, l'increment del GMPc produït pels IPDE5s, disminueix el calci intracel·lular i afavoreix la relaxació de les CMLVs, reduint la seva contractilitat. Però en el miocardi hipertrofiat, els IPDE5s augmenten els nivells de GMPc i aquest realitza la seva funció a través de la inhibició de la PDE3, que a la vegada activa la PKA, incrementa el calci

intracel·lular i millora la contractilitat del miocardi<sup>57</sup>. També existeixen altres mecanismes a través dels quals el sildenafil exerceix efectes protectors sobre el remodelat cardíac patològic, com la reducció de la fibrosi, observada en el nostre model, i de l'apoptosi cardíaca. En un model d'insuficiència cardíaca en ratolins, el tractament amb sildenafil va causar una disminució significativa de la fibrosi, així com de l'apoptosi i de l'hipertrofia ventricular<sup>589</sup>. Els autors van concloure que els efectes provocats pel sildenafil van ser mediatos per l'activació de la PKG (efectes antifibròtics) i per l'augment de Bcl-2 (efectes antiapoptòtics). Així doncs, sembla ser que l'acció del sildenafil interfereix en diverses i complexes cascades de senyalització intracel·lular contribuint a la millora del remodelat patològic cardíac. El present estudi suggereix un paper principal del TGF- $\beta$ 1, en els efectes antifibròtics observats sobre l'AE. Tanmateix, un anàlisi més exhaustiu de la interacció del sildenafil a través de l'increment del GMPc sobre aquestes vies seria molt interessant per comprendre els efectes beneficiosos observats en el nostre model.

## 7.4. PATOLOGIA CARDÍACA I SAOS

### 7.4.1. Models animals de SAOS i arritmogènesi

El model de SAOS utilitzat en el nostre estudi, a més d'induir HI, va permetre aplicar oscil·lacions de la pressió intratoràcica amb increments marcadament negatius<sup>372</sup>. Ambdós factors poden contribuir al desenvolupament de FA a través de diferents mecanismes: la HI indueix una elevació de la pressió sanguínia, mentre un increment de les pressions intratoràciques pot conduir a una major pressió transmural del VE<sup>593</sup>, sotmetent a les aurícules a una distensió crònica que finalment causa dilatació i un increment de fibrosi. Estudis previs han mostrat una inducibilitat de FA incrementada en models animals en que s'indueixen obstruccions agudes de la via aèria, probablement mediada per desequilibris del sistema autonòmic<sup>339,340</sup>. Els efectes de la SAOS sobre l'estructura cardíaca a nivell histològic s'ha estudiat en pocs treballs. *Iwasaki et al.*<sup>594</sup> van suggerir un possible paper de la dilatació de l'AE com a substrat per la promoció de FA en un model agut de SAOS en rates obeses. A nivell dels ventricles, s'han observat àrees multifocals de necrosi induïdes per obstruccions intermitents de la respiració en un model agut<sup>595</sup>. Tanmateix, els efectes cardíacs a llarg termini de la SAOS sobre les propietats de les aurícules i la susceptibilitat a desenvolupar FA no han estat investigades en models experimentals. El present estudi va ser el primer en descriure el desenvolupament d'un substrat arritmogènic a les aurícules en un model crònic de SAOS. Estudis posteriors han confirmat les nostres troballes<sup>504</sup>.

### 7.4.2. Remodelat profibròtic auricular associat a la SAOS

Els resultats van mostrar un increment de fibrosi a les aurícules mentre que no es van observar diferències en el dipòsit de col·lagen quantificat a nivell de les parets lliures del VD i del VE. Aquest augment de fibrosi selectiu a nivell de les aurícules també s'ha observat en altres models experimentals<sup>572,596,597</sup>.

Les diferències de força d'estirament i de càrrega mecànica entre les aurícules i els ventricles<sup>112</sup>, la diferent reactivitat dels fibroblasts en ambdues cavitats<sup>598</sup>, un increment de l'ECA i una disminució de la MMP-2 a les aurícules<sup>599</sup>, són mecanismes que podrien explicar la major susceptibilitat a la fibrosi auricular en el nostre model. És conegut que el contingut de col·lagen al miocardi depèn de l'equilibri entre la seva síntesi i la seva degradació, i que aquest està controlat, en gran part, per les MMPs. El nostre model de SAOS crònica suggereix que una sobreexpressió d'ECA<sup>599</sup> i una menor expressió de MMP-2<sup>600</sup>, podrien promoure l'aparició de fibrosi. La MMP-2 tindria un paper central en el procés de fibrosi a les aurícules, tal i com demostra la disminució de la seva expressió únicament a les cavitats auriculars. De forma contrària, el paper de l'ECA sembla ser menys important, tenint en compte que es va observar un increment de la seva expressió en les quatre cavitats cardíaques associat a la SAOS però únicament es va trobar presència de fibrosi a les aurícules. A més, l'expressió d'ARNm de TGF- $\beta$ 1, un important activador de la resposta fibròtica modulada a través de l'ECA, no es va trobar incrementada en les rates SAOS. Altres marcadors de degradació de la MEC (MMP-9, TIMP-1, TIMP-2) així com de la polimerització de col·lagen (LOX), tampoc es van trobar alterats per la SAOS en el nostre model.

A més d'un efecte profibròtic, existeix una creixent evidència científica que senyala la SAOS com una malaltia proinflamatòria<sup>601</sup>. Un estudi previ en un model animal agut ja va demostrar un increment de la resposta inflamatòria sistèmica promoguda per la SAOS<sup>556</sup>. Els nostres resultats confirmen aquesta troballa i demostren inflamació miocàrdica local en un model crònic, reflectida per un increment de l'ARNm de la citocina proinflamatòria IL-6 en les dues aurícules i al VE. La inflamació i la fibrosi són dos processos que es troben molt lligats, amb vies de senyalització cel·lulars interrelacionades. Per exemple, la IL-6 es troba involucrada en el desenvolupament de fibrosi miocàrdica en altres models experimentals<sup>602</sup>. En el nostre model, la concentració plasmàtica de la IL-1 $\beta$ , va augmentar amb la SAOS, i va correlacionar amb un major grau de fibrosi tissular a les aurícules mentre que no va correlacionar amb la fibrosi ventricular. Aquests resultats també reforcen la idea d'una major reactivitat dels fibroblasts presents a les aurícules en comparació amb el VE<sup>598</sup>.

El desenvolupament de fibrosi auricular en aquest model de SAOS podria tenir implicacions clíniques importants si es confirma en humans. En primer lloc, s'ha demostrat que la SAOS indueix de manera directa un remodelat arritmogènic de les aurícules, i que aquests canvis no estan mediatos per la presència d'altres comorbiditats com la hipertensió, l'obesitat, la malaltia coronària arterial o la diabetis, les quals són molt prevalents en pacients amb SAOS<sup>603</sup>. En conseqüència, seria important la revisió de la presència de SAOS en pacients amb FA amb l'objectiu d'establir una causa directa sobre l'arítmia. En segon lloc, els resultats podrien millorar el pronòstic d'aquests pacients, tenint en compte que tant la SAOS com la fibrosi auricular són predictors de poca resposta al tractament de FA. Finalment, tenint en compte que la SAOS es pot tractar, una detecció precoç i un tractament adient amb CPAP o teràpies noves podria retardar la progressió del substrat de FA i millorar els resultats del tractament antiarítmic amb medicació, cardioconversió elèctrica o ablació de la FA.

Una de les principals limitacions en el present estudi és la manca d'un estudi electrofisiològic i d'inducibilitat d'arítmies *in vivo* amb l'objectiu de valorar si la presència de fibrosi observada a les aurícules va acompanyada d'un increment de la susceptibilitat a desenvolupar FA. Tanmateix, l'aparició de fibrosi a les aurícules és una característica que emmarca la FA i la seva presència se sap que promou el seu desenvolupament<sup>107</sup>. A més, els nivells de fibrosi quantificats en aquest estudi són comparables als obtinguts en altres models experimentals associats a una major inductivitat a FA<sup>359</sup>. Anàlisis addicionals com per exemple l'estudi de les dimensions de les cavitats auriculars mitjançant ecocardiografia o l'avaluació del remodelat elèctric s'haurien de considerar en estudis futurs.

#### **7.4.3. Ús de CMMs per prevenir el remodelat profibròtic auricular**

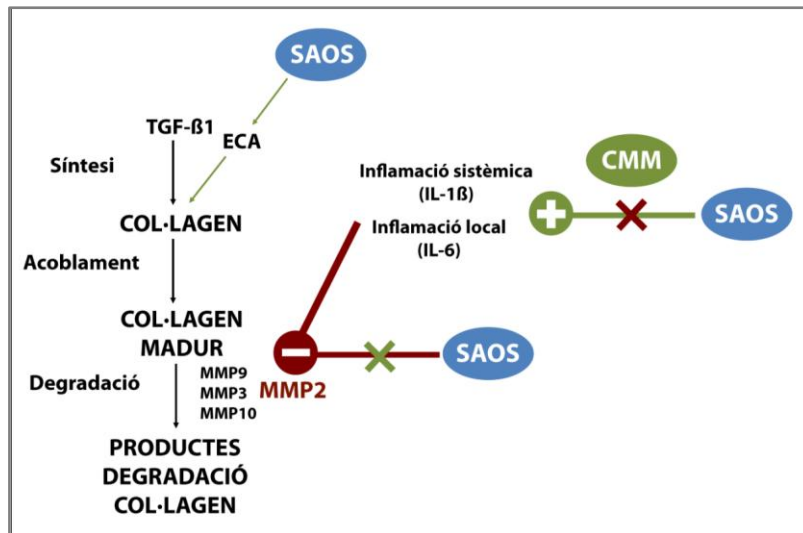
El nostre estudi demostra que la fibrosi auricular induïda per la SAOS es pot prevenir amb la infusió de CMMs. Les rates SAOS que van ser tractades amb CMMs van presentar una fracció de col·lagen a les aurícules similar al grup Sham+S. Aquest efecte protector va anar acompanyat d'un increment de l'expressió d'ARN i dels nivells de proteïna de MMP-2, fet que sugereix una major degradació de la MEC i, en conseqüència, a una disminució de l'acumulació de col·lagen. Tot i que la infusió de CMMs va prevenir la fibrosi en el nostre model, no va reduir l'expressió de l'ECA, suggerint que el marcador ECA no és suficient per mantenir la fibrosi auricular induïda per la SAOS. Per altra banda, després de la infusió de les CMMs es va observar una disminució tant de la inflamació sistèmica (IL-1 $\beta$ ) com de la inflamació local (IL-6). En línia amb els nostres resultats, els beneficis obtinguts amb les CMMs en altres models animals es creu que estan supeditats als seus efectes antiinflamatoris<sup>603,604</sup>. L'expressió de la resta de marcadors de la

síntesi/degradació de la MEC (MMP-9, TIMP-1, TIMP-2) i de la polimerització del col·lagen (LOX), tampoc es van modificar per la infusió de CMMs.

Diversos estudis on s'ha utilitzat la tècnica de trasplantament de CMMs, han mostrat una disminució significativa de la fibrosi del cor<sup>356,605</sup>, del pulmó<sup>606</sup>, dels ronyons<sup>607</sup>, de la pell<sup>608</sup> i del fetge<sup>609</sup>. Tot i que els mecanismes a través dels quals les CMMs aconseguen aquest efecte encara no han estat completament descrits, estudis previs suggereixen que un augment de l'expressió de MMP-2 induït per les CMMs podria tenir un paper central en la reducció de la fibrosi. De manera remarcable, un estudi en ratolins va demostrar que els efectes antifibròtics de les CMMs sobre la pell estaven modulats per una major degradació de col·lagen induïda per un increment de l'expressió de MMP-2<sup>608</sup>. De forma similar, *Mias et al.*<sup>610</sup> van observar una reducció de la fibrosi ventricular en un model d'infart de miocardi en rata promoguda per la injecció de CMMs, a través de l'estimulació de la secreció de MMP-2 i MMP-9 pels fibroblasts. D'altra banda, en fibroblasts *knock-out* per MMP-2 no es va observar l'efecte protector de la fibrosi per les CMMs<sup>610,611</sup>. Aquests estudis suggereixen que aquest efecte es troba influenciat per mecanismes promotors del sistema de senyalització paracrí/endocrí. En el nostre estudi, el fet de no haver trobat una evidència de la localització de CMMs en el miocardi reforça la idea d'un efecte sistèmic antiinflamatori de les CMMs.

Basant-nos en els resultats obtinguts en el nostre estudi, es proposa la següent explicació mecanística (resumida en la figura 74): La SAOS actua com a estímul pro-inflamatori i inhibeix la síntesi de MMP-2, reduint en conseqüència la degradació de col·lagen i afavorint d'aquesta manera la seva acumulació a la MEC. L'administració de CMMs frena el procés inflamatori, normalitza la síntesi de MMP-2 i d'aquesta manera incrementa la degradació de col·lagen prevenint el seu dipòsit tissular. Per altra banda, tot i que la SAOS incrementa l'expressió de la proteïna ECA a les aurícules, aquest enzim no sembla que jugui un paper central en la promoció de la síntesi de col·lagen.

El nostre estudi confirma la SAOS com a factor de risc cardiovascular, afavorint el desenvolupament d'un substrat per a FA i suggereix que les CMMs podrien ser útils en la prevenció del remodelat profibròtic auricular induït per la SAOS. Tanmateix, les implicacions clíniques en humans que se'n deriven necessiten ser investigades.



**Figura 74. Fisiopatologia proposada de la fibrosi auricular induïda per la SAOS i mecanisme d'acció de les CMM.** Les línies verdes representen activació i les línies vermelles inhibició. SAOS: Síndrome d'apnea obstructiva del son; CMM: cèl·lules mare mesenquimals.





## **8. CONCLUSIONS GLOBALS**



Amb els resultats obtinguts en aquesta tesi, podem concloure que:

1. L'exercici físic de molt elevada intensitat i la SAOS són dues causes emergents de patologia cardiovascular que promouen canvis maladaptatius a nivell vascular i cardíac. Aquests canvis podrien ser la base de l'increment de la incidència de la malaltia ateroscleròtica i de la FA en individus amb aquestes condicions.
2. La dosi d'exercici físic és central en l'adaptació vascular: mentre que l'activitat física moderada millora la funció vascular, l'exercici físic perllongat de molt elevada intensitat indueix canvis patològics. Aquests canvis es resumeixen en graus variables de fibrosi, rigidesa i hiperreactivitat de la capa mitjana muscular de les artèries elàstiques i musculars. Les diferents dosis d'exercici s'associen a patrons característics d'expressió de miARNs en la paret arterial que podrien constituir un mecanisme regulador important.
3. La fibrosi auricular pot contribuir a la FA induïda per l'exercici. En l'aurícula esquerra, el sildenafil inhibeix la fibrosi per un mecanisme en el que està implicat el TGF- $\beta$ 1.
4. En la SAOS, l'estrès oxidatiu i l'activació del SRAA participen probablement en l'engruiximent i la dilatació aòrtica. L'ús de CMMs atenua aquests canvis, inhibint l'activació del SRAA i la producció de superòxid.
5. La fibrosi auricular promoguda per una reducció en la degradació del col·lagen podria ser un mecanisme fisiopatològic important en el desenvolupament de la FA en pacients amb SAOS. Les CMMs prevenen aquest remodelat possiblement a través d'un mecanisme antiinflamatori.



## **9. ANNEX**



**Atrial fibrosis in a chronic murine model of obstructive sleep apnea: mechanisms and prevention by mesenchymal stem cells**

Pablo Ramos, Cira Rubies, Marta Torres, Montserrat Batlle, Ramón Farré, Josep Brugada, Josep Maria Montserrat, Isaac Almendros, Lluís Mont.

Article publicat a **Respiratory Research**

2014 (28 April);15:54.





RESEARCH

Open Access

# Atrial fibrosis in a chronic murine model of obstructive sleep apnea: mechanisms and prevention by mesenchymal stem cells

Pablo Ramos<sup>1</sup>, Cira Rubies<sup>1</sup>, Marta Torres<sup>2</sup>, Montserrat Batlle<sup>1</sup>, Ramon Farre<sup>3</sup>, Josep Brugada<sup>1</sup>, Josep M Montserrat<sup>2</sup>, Isaac Almendros<sup>2†</sup> and Lluís Mont<sup>1\*†</sup>

## Abstract

**Background:** OSA increases atrial fibrillation (AF) risk and is associated with poor AF treatment outcomes. However, a causal association is not firmly established and the mechanisms involved are poorly understood. The aims of this work were to determine whether chronic obstructive sleep apnea (OSA) induces an atrial pro-arrhythmogenic substrate and to explore whether mesenchymal stem cells (MSC) are able to prevent it in a rat model of OSA.

**Methods:** A custom-made setup was used to mimic recurrent OSA-like airway obstructions in rats. OSA-rats (n = 16) were subjected to 15-second obstructions, 60 apneas/hour, 6 hours/day during 21 consecutive days. Sham rats (n = 14) were placed in the setup but no obstructions were applied. In a second series of rats, MSC were administered to OSA-rats and saline to Sham-rats. Myocardial collagen deposit was evaluated in Picrosirius-red stained samples. mRNA expression of genes involved in collagen turnover, inflammation and oxidative stress were quantified by real time PCR. MMP-2 protein levels were quantified by Western Blot.

**Results:** A 43% greater interstitial collagen fraction was observed in the atria, but not in the ventricles, of OSA-rats compared to Sham-rats (Sham  $8.32 \pm 0.46\%$  vs OSA  $11.90 \pm 0.59\%$ ,  $P < 0.01$ ). Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) and Interleukin 6 (IL-6) expression were significantly increased in both atria, while Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) expression was decreased. MSC administration blunted OSA-induced atrial fibrosis (Sham + Saline  $8.39 \pm 0.56\%$  vs OSA + MSC  $9.57 \pm 0.31\%$ ,  $P = 0.11$ ), as well as changes in MMP-2 and IL-6 expression. Interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) plasma concentration correlated to atrial but not ventricular fibrosis. Notably, a 2.5-fold increase in IL-1 $\beta$  plasma levels was observed in the OSA group, which was prevented in rats receiving MSC.

**Conclusions:** OSA induces selective atrial fibrosis in a chronic murine model, which can be mediated in part by the systemic and local inflammation and by decreased collagen-degradation. MSCs transplantation prevents atrial fibrosis, suggesting that these stem cells could counterbalance inflammation in OSA.

**Keywords:** Obstructive sleep apnea, Atrial fibrillation, Cardiac fibrosis, Mesenchymal stem cells, Animal model

\* Correspondence: [lmont@clinic.ub.es](mailto:lmont@clinic.ub.es)

†Equal contributors

<sup>1</sup>Thorax Institute, Unitat de Fibril·lació Auricular, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Catalonia, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

Patients with obstructive sleep apnea (OSA) show both a high prevalence [1] and incidence [2] of atrial fibrillation (AF). In addition, OSA has been associated with a greater risk of AF recurrence after cardioversion [3] and catheter ablation [4,5] and a worse response to antiarrhythmic drugs [6]. Despite the clear association between OSA and AF, it is not firmly established whether this association is causal or mediated by other comorbidities often present in OSA-patients, such as obesity or hypertension [7].

Atrial structural remodeling, particularly fibrosis, is a main component in the substrate predisposing to AF [8]. Atrial fibrosis predicts disease progression and treatment outcomes [9]. It is known from murine models that exposure to recurrent airway obstructions promotes early myocardial inflammation leading to myocardial apoptosis at mid-term [10]. However, it remains unknown whether chronic exposure to recurrent apneas can reach to develop atrial fibrosis, thus explaining the higher prevalence and incidence of AF observed in OSA patients. In addition, cell-based therapies emerge as an attractive alternative to classic pharmacological treatments for the prevention of such remodeling, thereby reducing AF occurrence and progression. Among the options available for cell therapy, bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) appear as a promising source of stem cells because of their multi-lineage potential, anti-inflammatory effects [11,12], ability to escape detection by the host immune system, and a relative ease of expansion in culture [13,14]. Recent studies have shown that MSCs attenuate cardiac fibrosis in a variety of experimental settings [15-17]. Although the knowledge on the therapeutic role of MSC in OSA models is very limited [18], there is evidence that stem cells possess anti-inflammatory properties that mitigate the early inflammatory response [11].

The aim of our study was 1) to describe OSA-induced atrial remodeling in a chronic murine model, 2) to analyze the putative mechanisms involved and 3) to investigate whether MSC have the potential to prevent such remodeling in the same OSA model.

## Methods

### Experimental sleep apnea model

This study conformed to European Community (Directive 86/609/EEC) and Spanish guidelines for the use of experimental animals and was approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of Barcelona.

A chronic model of OSA previously validated by our group was used [19]. The model was designed to apply recurrent airway obstructions with an OSA pattern. Briefly, it was based on a custom-made setup consisting of 2 chambers (to fit the body and head) separated by a

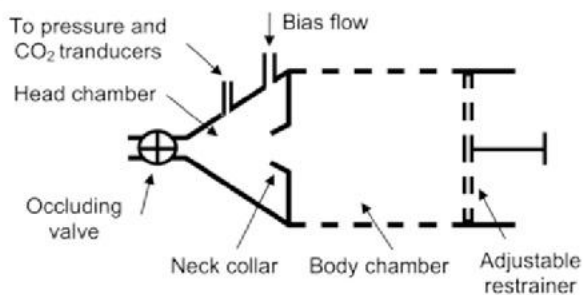
latex neck collar (Figure 1). The head chamber had a conical shape and was built small enough to contain the minimum possible air volume when the rat was in place. The rat breathed room air through an orifice at the vertex of the conical head chamber. A valve was placed at the entrance of the head chamber, allowing for the closure of the orifice. The valve was electronically controlled to produce intermittent obstructions mimicking those that characterize OSA, resulting in increased breathing efforts, oxygen desaturations and intermittent hypercapnia. To ensure the development of obstructive apneas, the head chamber was connected to air flow, pressure and CO<sub>2</sub> transducers; pulse oximetry was measured at the rat tail. These parameters were continuously monitored by an experimented researcher who certified effective apneas (i.e., no air flow, pressure swings, increased CO<sub>2</sub> and decreased pulse oximetry).

The first part of the study was carried out in 30 Sprague-Dawley male rats (250–300 g and 8 weeks old at the beginning of the experiment) randomized into 2 groups: OSA and Sham. OSA-rats (n = 16) were subjected to 15-second obstructions at a rate of 60 per hour, 6 hours per day during 21 consecutive days. Sham-rats (n = 14) were placed in the setup during the same period of time (21 days, 6 hours per day), but no obstructions were applied. Rats in both groups were progressively adapted to the experimental setting by increasing the time within the OSA/Sham device at a rate of 1 hour each day, up to 6 h at the end of the first week. Rats were housed in a controlled environment (12/12-hour light/dark cycle) and fed rodent chow and tap water *ad libitum*.

### Mesenchymal stem cells infusion

To evaluate the effect of MSC in OSA-induced structural remodeling, 8 rats undergoing the previously described OSA protocol were infused with MSC (OSA + MSC group). Seven Sham rats receiving saline vehicle (Sham + S group) were used as controls in this experiment.

MSC were obtained by culturing well-characterized Lewis rat marrow stromal cells kindly provided by the



**Figure 1 Experimental obstructive sleep apnea (OSA) setup.** Diagram of the experimental setup to noninvasively apply recurrent airway obstructions in the rat. See text for explanation.

Tulane Center for Gene Therapy (New Orleans, LA, USA). The cells were cultured in MEM-alpha medium with glutamine and without ribonucleosides or deoxyribonucleosides (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA), supplemented with 20% fetal bovine serum (HyClone Cell Culture, Cultek, Madrid, Spain), 1% antibiotic-antimycotic (containing 10,000 U/mL Penicillin G sodium; 10,000 µg/mL Streptomycin sulphate; 25 µg/mL Amphotericin B as Fungizone [GIBCO, Gaithersburg, MD, USA]) and 2% l-glutamine (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA). The cells were grown at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% humidity. Subconfluent cells were dissociated with 0.25% trypsin and 1 mM Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) in Hanks' Balanced Salt Solution (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA) and subcultured at low density in new culture flasks. To prepare the injection, MSC were trypsinized and 5 × 10<sup>6</sup> cells were suspended in 500 µL of Phosphate Buffered Saline (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA). This cell preparation was slowly delivered (30 seconds) to the rat through the penile vein the first day of apneas application and every 4 days thereafter. Rats were anaesthetized with short-acting inhaled isoflourane (2%) before and during every injection.

All rats in the four experimental groups (Sham, Sham + S, OSA, OSA + MSC) were carefully inspected daily to monitor animal well-being. No rats showed any signs of stress or MSC-related side effects and thus, no rats needed to be excluded from the analysis.

#### Sample collection and RNA isolation

Once anesthetized with intraperitoneal urethane 10% (1 g/kg), animals were sacrificed by exsanguination through carotid artery cannulation. Blood samples were collected in EDTA tubes and centrifuged for 15 minutes at 3000 rpm. Plasma was collected and frozen at -80°C.

Hearts were quickly removed and weighted, and tissue samples were obtained from the left ventricle (LV) free wall, right ventricle (RV) free wall, and both atrial appendages: right atrium (RA) and left atrium (LA). Samples were snap-frozen in liquid nitrogen for posterior molecular biology analysis. For histological studies, transversal sections from the midventricular and basal (including both atria) regions of the heart were obtained, fixed in formol 3% for 24 hours and embedded in paraffin.

Total RNA was isolated from the 4 cardiac chambers. Myocardial tissue was first homogenized with Trizol<sup>®</sup> reagent (Life Technologies) and further purified with chloroform (C-2432, Sigma-Aldrich). Final RNA was obtained with silica columns (RNA Aqueous kit, Ambion) according to the manufacturer's protocol. The integrity of the resulting RNA was assessed in formaldehyde-denaturing agarose gels. A reverse transcription protocol with random primers was applied to 1 µg of total RNA

for cDNA synthesis with the addition of RNase inhibitors (High capacity cDNA RT kit, Life Technologies, CA, USA) with a MJ Research PTC 200 thermal cycler (MJ Research, MA, USA).

#### Real time polymerase chain reaction (real time PCR)

Messenger RNA (mRNA) expression of selected key-player genes in the collagen synthesis and degradation balance was measured in the four cardiac chambers. Genes involved in collagen-synthesis promotion (ACE, TGF-β1), collagen maturation and cross-linking (LOX), and degradation (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2), as well as oxidative stress (eNOS) and inflammation (IL-6) were quantified. mRNA expression was assayed with a real-time PCR 7900 thermal cycler (AB, Applied Biosystems, CA, USA) using TaqMan Universal PCR Master Mix with AmpErase UNG. Specific TaqMan single-gene expression assays are shown in Table 1. All mRNA quantification results are shown relative to a cDNA pool with sequential dilutions and units are given as ng-equivalents of cDNA (ng-equ).

#### Protein isolation and analysis by western blot

Myocardial proteins were extracted from each heart cavity in all experimental groups. Samples were submerged in 0.5 mL of ice-cold protein lysis buffer containing: RIPA buffer (R0278, Sigma), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (P7626, Sigma), 1 mM sodium orthovanadate (S6508, Sigma), 1 mM Pefabloc (11429868001, Roche) and complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (11836153001, Roche). Samples were homogenized with an Omni TH homogenizer (Omni International Inc.). After 1 hour of rotation at 4°C, samples were centrifuged at 10.000 g at 4°C for 30 minutes. The upper phase was collected and the total protein concentration was quantified with the Pierce BCA protein Assay method (23227, Thermo Scientific, Pierce) relative to a BSA standard curve. Forty

**Table 1 TaqMan one-gene expression assays**

Gene	Abbreviation	TaqMan reference
Angiotensin-I Converting Enzyme	ACE1	Rn00561094_m1
Transforming Growth Factor-β1	TGF-β1	Rn00572010_m1
Lysyl Oxidase	LOX	Rn01491829_m1
Matrix Metalloproteinase-2	MMP-2	Rn01538170_m1
Matrix Metalloproteinase-3	MMP-3	Rn00591740_m1
Matrix Metalloproteinase-9	MMP-9	Rn00579162_m1
Matrix Metalloproteinase-10	MMP-10	Rn00591678_m1
Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1	TIMP1	Rn00587558_m1
Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2	TIMP2	Rn00573232_m1
Nitric Oxide Synthase III	NOS3	Rn02132634_s1
Interleukin-6	IL-6	Rn01410330_m1

$\mu\text{g}$  of total protein extract were loaded with a reducing buffer (2.5% of  $\beta$ -mercaptoethanol) to NuPage<sup>®</sup> 4–12% Bis-Tris Gel (NP0322). A western blot was performed with the Novex<sup>®</sup> gels methodology (Invitrogen). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using a blot gel transfer (IB3010-01) and the iBlot<sup>®</sup> Dry Blotting System. Proper transfer was checked by Ponceau staining. After 1 hour blockade of the membrane with phosphate buffered saline solution (PBS, Fisher Scientific), 0.1% Tween 20 (P1379, Sigma-Aldrich) and 5% of skimmed milk, it was incubated overnight at 4°C with the MMP-2 primary antibody (ab37150, Abcam) diluted 1/500. Afterwards, the membrane was incubated during 1 hour with an HRP-Goat anti rabbit secondary antibody diluted 1/1000 (31460 Thermo Scientific). Final detection of the MMP-2 protein bands was accomplished with the ECL kit Super-signal West Pico Chemiluminescent Substrate (34080, Thermo Scientific).

Bands around 60 KDa for MMP-2 (in antibody and ECL incubated membranes) and around 40 KDa (in Ponceau-stained membranes) were quantified (ImageJ, NIH, Maryland, USA). Loading of each sample was normalized with the Ponceau band around 40 KDa. Results are given in arbitrary units (A.U.) as the ratio between the normalized densities of each sample divided by the normalized density of a standard loaded in each gel.

#### Plasma cytokines

Systemic inflammation-related cytokines -proinflammatory and profibrotic Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), and anti-inflammatory Interleukin-10 (IL-10)- were measured in plasma obtained at sacrifice with Quantikine ELISA assays RLB00 and R1000, respectively (R&D Systems, MN, USA).

#### CD90 immunofluorescence

A CD90 immunofluorescence assay was performed in myocardial paraffin-embedded sections from rats injected with MSC, and in MSC cultured in 30–40% confluent chamber slides (positive control). Cultured MSC were fixed with 4% paraformaldehyde. Antigenic retrieval was achieved with a sodium citrate 10 mM bath at 80°C during 40 min. After blockade of unspecific unions, samples were incubated overnight with Anti-Rat CD90, FITC conjugated antibody (MR5001, Caltag, Invitrogen) diluted 1/200. Sudan Black was used to mask auto-fluorescence. Both myocardial sections and chambers were added a DAPI-containing mounting media and covered. The same staining protocol excluding Anti-CD90 antibody addition was used as a negative control for both groups.

#### Myocardial fibrosis quantification

Mid-ventricular and atrial sections of paraffin-embedded tissue, 4 microns thick, were stained with Picrosirius-red as previously described [20]. Four random pictures (40 $\times$ )

from RV and LV free wall, and 6 random pictures (100 $\times$ ) from the atria were taken from each sample with an Olympus BX51 microscope and an Olympus DP50 camera (Olympus Corporation, Japan).

To estimate hypertrophy of the cardiac chambers, RV free wall, interventricular septum (IVS) and LV free wall thickness were measured in transversal sections at mid-ventricular level. The interstitial collagen fraction was assessed with a semiautomatic color-threshold detection software (AnalySIS<sup>®</sup>, Soft Imaging System, Germany). Right and left atrial collagen fraction were quantified together. Epicardial, endocardial, and perivascular fibrosis were excluded from the analysis. All measures were carried out blind by a single investigator.

#### Statistical analysis

All variables followed a normal distribution (Shapiro-Wilks test) and are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Grubbs test was used to exclude extreme outliers (maximum one per group). Comparisons between 2 groups were carried out with a non-paired Student's t-test. A Pearson product-moment correlation coefficient was computed to assess the relationship between the plasmatic IL-1 $\beta$  levels and the myocardial collagen fraction. Statistical calculations were performed with SPSS v16.0 (SPSS Institute Inc, Cary, NC, USA). A p-value <0.05 was considered for significance.

## Results

### Obstructive sleep apnea induces atrial fibrosis

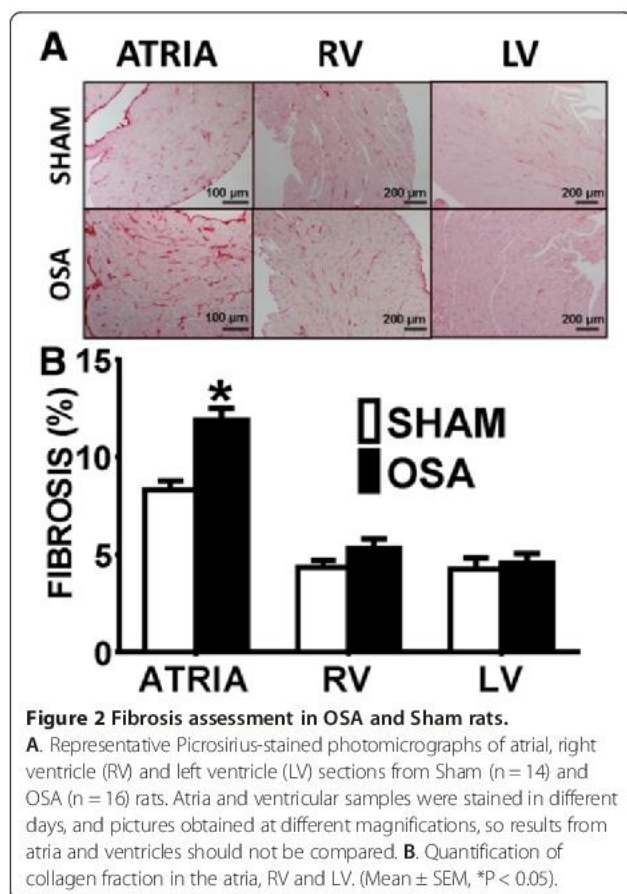
#### Histological analysis

The 3-week OSA protocol did not induce global or specific-chamber hypertrophy in rats. No significant differences between both groups were found in heart weight (Sham 1.21  $\pm$  0.02 g, vs OSA 1.14  $\pm$  0.03 g, P = 0.08), RV free wall thickness (Sham 938  $\pm$  55  $\mu\text{m}$  vs OSA 876  $\pm$  65  $\mu\text{m}$ , P = 0.49), IVS thickness (Sham 2234  $\pm$  162  $\mu\text{m}$  vs OSA 2069  $\pm$  190  $\mu\text{m}$ , P = 0.54) or LV free wall thickness (Sham 2427  $\pm$  178  $\mu\text{m}$  vs OSA 2300  $\pm$  190  $\mu\text{m}$ , P = 0.64).

We evaluated myocardial fibrosis in histological preparations. Figure 2A shows representative photomicrographs of Picrosirius-red stained LV, RV and atrial sections from Sham and OSA rats. OSA induced a significant 43% higher atrial interstitial collagen deposition as compared to the sham group (Figure 2B). Increased fibrosis deposition was diffuse and homogenous, with no patchy fibrotic infiltrates in any of the analyzed samples. No differences in collagen deposit density were observed between OSA and Sham groups in RV and LV free wall.

#### mRNA expression and protein synthesis

To study the mechanisms of myocardial fibrosis, we quantified mRNA expression of genes involved in myocardial collagen turnover, inflammation and oxidative



**Figure 2** Fibrosis assessment in OSA and Sham rats.

**A.** Representative Picrosirius-stained photomicrographs of atrial, right ventricle (RV) and left ventricle (LV) sections from Sham ( $n = 14$ ) and OSA ( $n = 16$ ) rats. Atria and ventricular samples were stained in different days, and pictures obtained at different magnifications, so results from atria and ventricles should not be compared. **B.** Quantification of collagen fraction in the atria, RV and LV. (Mean  $\pm$  SEM, \* $P < 0.05$ ).

stress in the 4 cardiac chambers of sham and OSA-rats. ACE expression was significantly greater in the RA, RV and LV, and was close to significance ( $p = 0.055$ ) in the LA, of OSA-rats compared with Sham-rats (Figure 3A). Expression of collagen promoters TGF- $\beta$ 1 and LOX was unaltered (Figure 4D, F). Regarding collagen degradation, MMP-2 expression was significantly decreased in both atria, but not in the ventricles (Figure 3B). No significant changes were found in any other metalloproteinase or metalloproteinase inhibitor (Figure 4A-C). MMP-3 and MMP-10 levels were undetectable and are not shown. Finally, IL-6 expression was significantly higher in both atria and in the LV of the OSA group, but showed no differences in the RV (Figure 3C).

As a potential regulator of myocardial fibrosis in our model, protein levels of MMP-2 were analyzed in the four cardiac chambers. Representative blots and quantification are shown in Figure 3E. MMP-2 protein levels were lower in left atria from OSA-rats than in left atria from Sham-rats ( $p = 0.03$ ), and showed borderline significance for the right atrium ( $p = 0.06$ ). No differences were found between Sham and OSA groups in the left and right ventricles.

#### Plasma cytokines

OSA-induced changes in systemic inflammation were studied in plasma samples. A remarkable 2.5-fold increase in pro-inflammatory IL-1 $\beta$  plasma levels was observed in the OSA group compared to the sham group (Figure 3D). IL-1 $\beta$  plasma levels positively correlated to atrial ( $r = 0.404$ ,  $p = 0.037$ , Figure 5A), but not ventricular ( $p = 0.21$ , Figure 5B) collagen fraction. Conversely, no differences were found in IL-10 plasma levels between both groups (Sham  $11.25 \pm 2.96$  pg/mL vs OSA  $7.85 \pm 1.41$  pg/mL,  $P = 0.26$ ). Plasma IL-10 did not correlate to either atrial or ventricular collagen fraction (results not shown,  $p = 0.209$  and  $p = 0.373$ , respectively).

#### Mesenchymal stem cells prevent sleep apnea-induced atrial fibrosis

##### Histological analysis

As in the first set of rats, no differences between OSA + MSC and Sham + S groups were found in heart weight nor in the ventricular collagen fraction. OSA-induced atrial fibrosis was prevented by the administration of MSC; OSA + MSC and Sham + S groups showed a similar atrial collagen fraction (Figure 6).

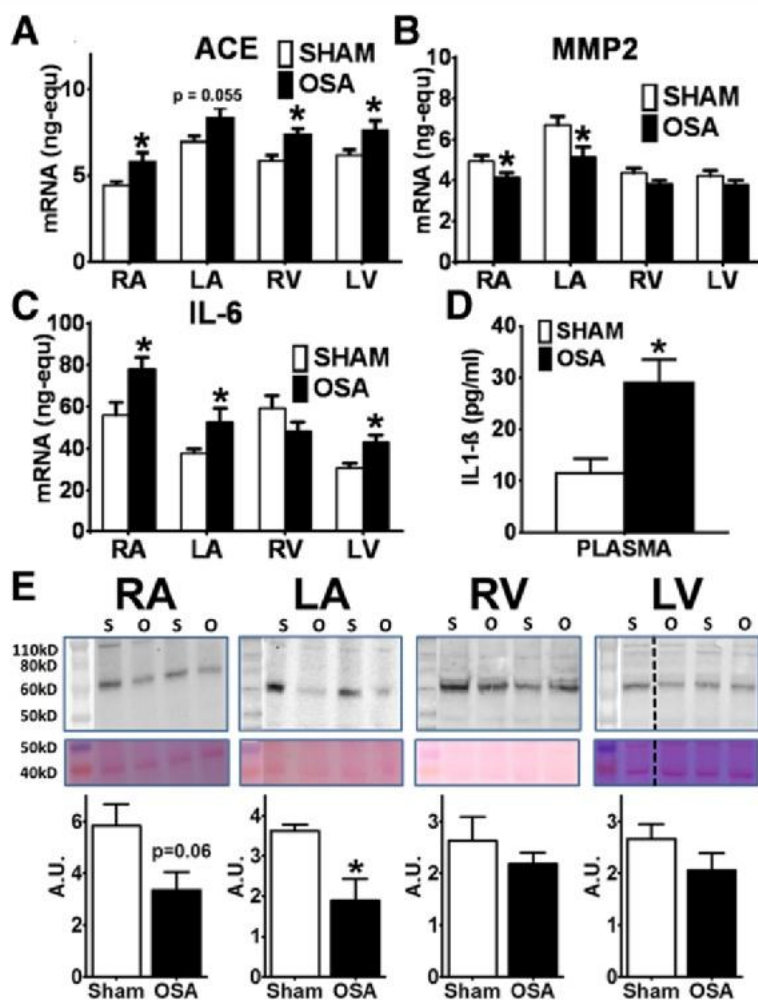
##### CD90 immunofluorescence

We used the sensitive MSC-marker CD90 to study their presence in the myocardium of OSA + MSC rats. Figure 7 shows representative microphotographies of a positive control (cultured MSC in A-B) and sample of interest (LA from OSA + MSC rats in C-D). After thoroughly exploring the myocardium samples, no CD90 positive cells were found in the atria or ventricles of five OSA + MSC rats myocardial tissue-sections.

##### mRNA expression and protein synthesis

Beneficial effects of MSC infusion in the atria of OSA rats were not accompanied by regression of changes in ACE mRNA expression. ACE mRNA expression remained higher in the RA and LA of OSA + MSC rats compared with Sham + S rats (Figure 8A). Conversely, MSC blunted OSA-induced atrial MMP-2 downregulation; MMP-2 expression was similar in OSA + MSC and Sham + S groups (Figure 8B). IL-6 OSA-induced increase was reverted after MSC-infusion (Figure 8C). No differences were observed in the expression of the other genes analyzed in the atria, though changes of uncertain significance were found for MMP-2 (Figure 8B), eNOS and TGF- $\beta$ 1 in the LV (Figure 9).

Results for MMP-2 mRNA expression in the atria were confirmed in protein levels quantification (Figure 8E). No differences were found in MMP-2 protein levels between Sham + S and OSA + MSC rats in the left or right atria. Contrary to mRNA expression, no differences were



**Figure 3** Fibrosis mechanisms assessment in OSA and Sham rats. (A) ACE, (B) MMP-2 and (C) IL-6 mRNA expression (ng-equ) in the four cardiac chambers of Sham (n = 14) and OSA (n = 16) rats (Mean ± SEM, \*P < 0.05). (D) Plasmatic concentration (pg/mL) of IL-1β in Sham and OSA (Mean ± SEM, \*P < 0.05). (E) MMP-2 protein levels quantification. Representative MMP-2 blots (upper panel), Ponceau-stained membranes (middle panel) and normalized quantification (lower panel) (Mean ± SEM, \*P < 0.05). n = 4-6/group. Left lane is a molecular-weight marker lane; the picture was obtained with visible light. Dashed line means non-contiguous lane. A.U.: Arbitrary Units.

seen in MMP-2 protein levels in the LV (Sham + S vs OSA + MSC).

#### Plasma cytokines

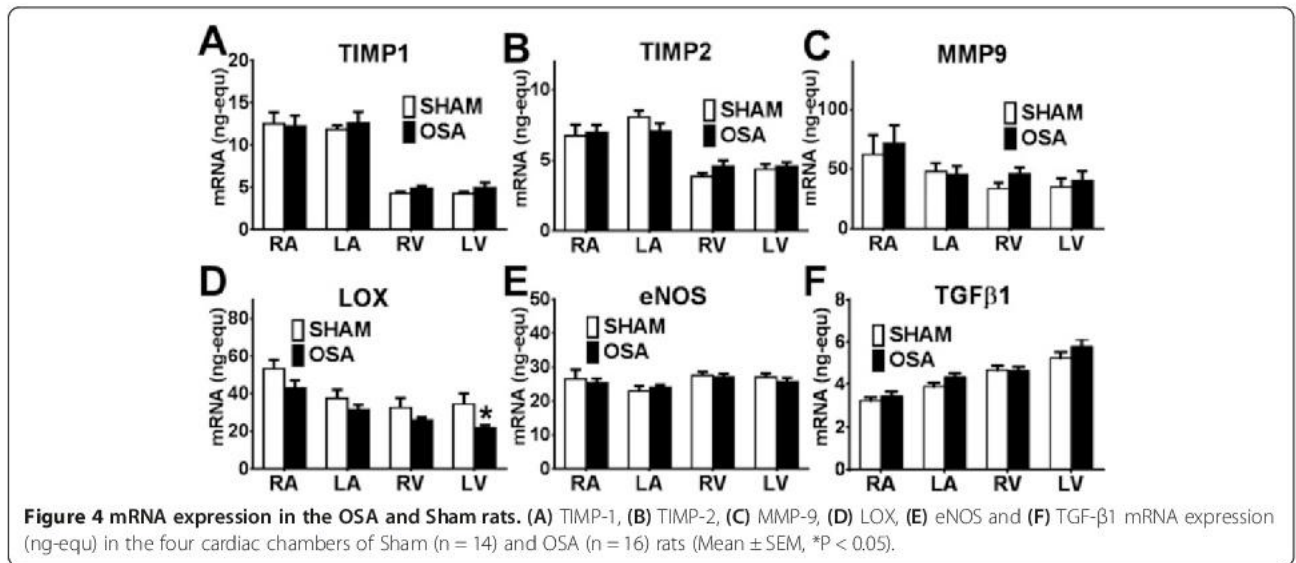
Figure 8D shows mean IL-1β levels in the Sham + S and OSA + MSC groups. OSA-induced increase in IL-1β plasma levels was blunted in the OSA group receiving MSC.

#### Discussion

In the present work, we have demonstrated for the first time that chronic exposure of rats to recurrent apneas can promote atrial fibrosis, an established substrate for AF. This process seems to be mainly mediated through an increased local and systemic inflammation and a reduced collagen-degradation. Also, our data revealed that

the OSA-induced fibrosis can be prevented by the infusion of MSC.

The application of intermittent hypoxia by modifying oxygen concentration in breathed gas, which is the most widely used model in OSA, is able to induce systemic inflammation. However, the setting employed in our work, in addition to intermittent hypoxia, allowed the application of increased negative intrathoracic-pressure swings [19]. These increased inspiratory efforts could aggravate the early local inflammatory response triggered by intermittent hypoxia alone. In addition, both factors could participate in the development of AF by different mechanisms; i.e. intermittent hypoxia can elevate the systemic blood pressure but also, increased intrathoracic pressure swings can increase left ventricular transmural pressure [21] and may lead to repetitive atrial stretch

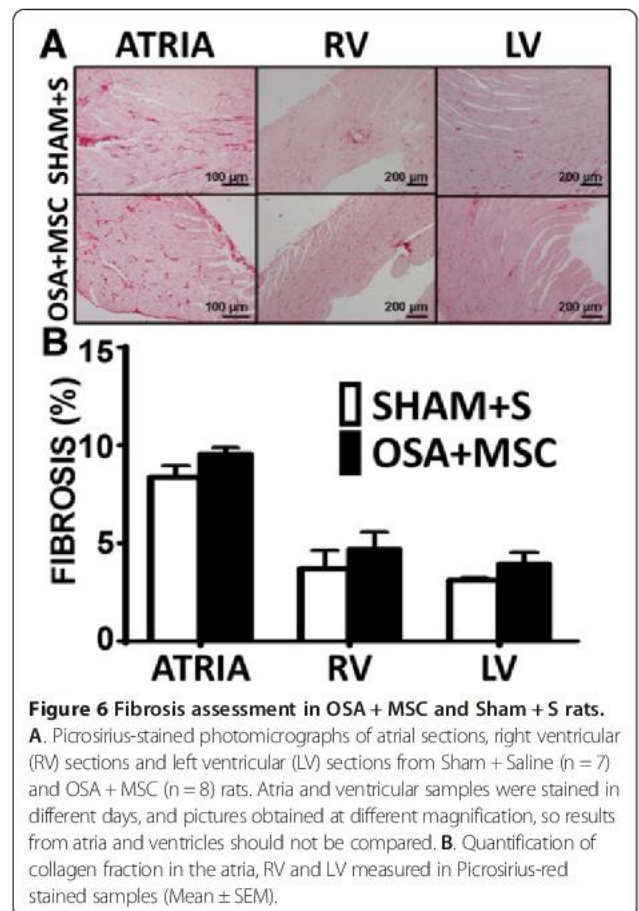
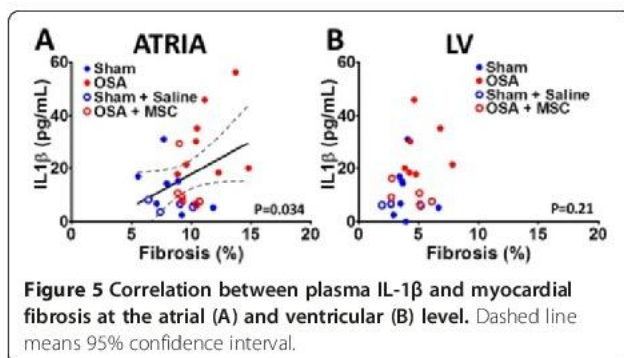


which chronically could lead to left atrial enlargement and fibrosis.

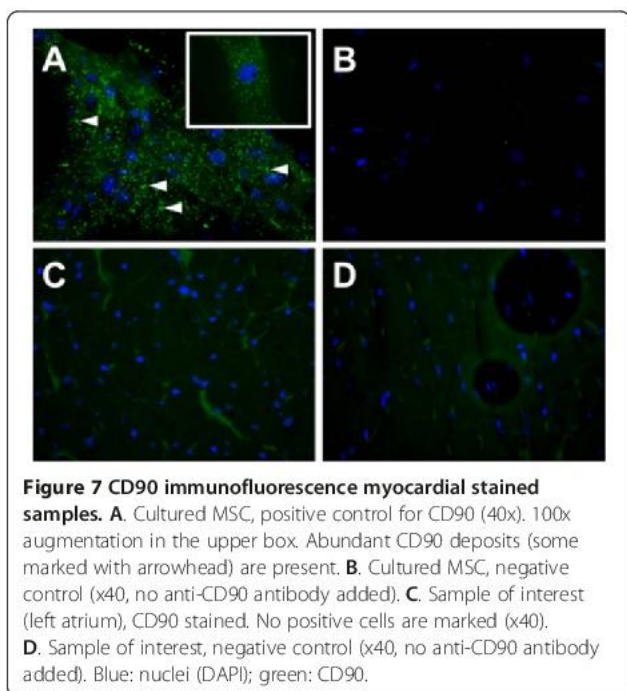
Previous experimental studies reported enhanced AF-inducibility in acute OSA models, likely mediated by imbalances in the autonomic system [22,23]. Iwasaki *et al.* [24] suggested a role for transient LA distension in AF substrate in an acute OSA model in obese rats. Few experimental works have studied the effects of OSA in cardiac structure at the histological level. Simpson *et al.* [25] showed that intermittent respiratory occlusions acutely induce multifocal areas of necrosis in both ventricles, and Chen *et al.* [26] described LV myocyte hypertrophy and apoptosis in a chronic intermittent hypoxia model. Neither of these two works studied atrial remodeling. To the best of our knowledge, our work is the first to describe the development of an arrhythmogenic structural substrate in the atria in a chronic OSA model.

Chamber-specific myocardial fibrosis (selective atrial fibrosis while preserving the ventricles) has been observed in our and other experimental settings [20,27-29]. Various mechanisms explain increased atrial susceptibility to fibrosis. Differential stretch and mechanical-loading properties

between the atria and ventricles [30], differences in atrial and ventricular-fibroblast reactivity [31], and increased fibrotic response to myocardial ACE activity in the atria [32] have been reported and may contribute to atrial fibrotic susceptibility in our model.







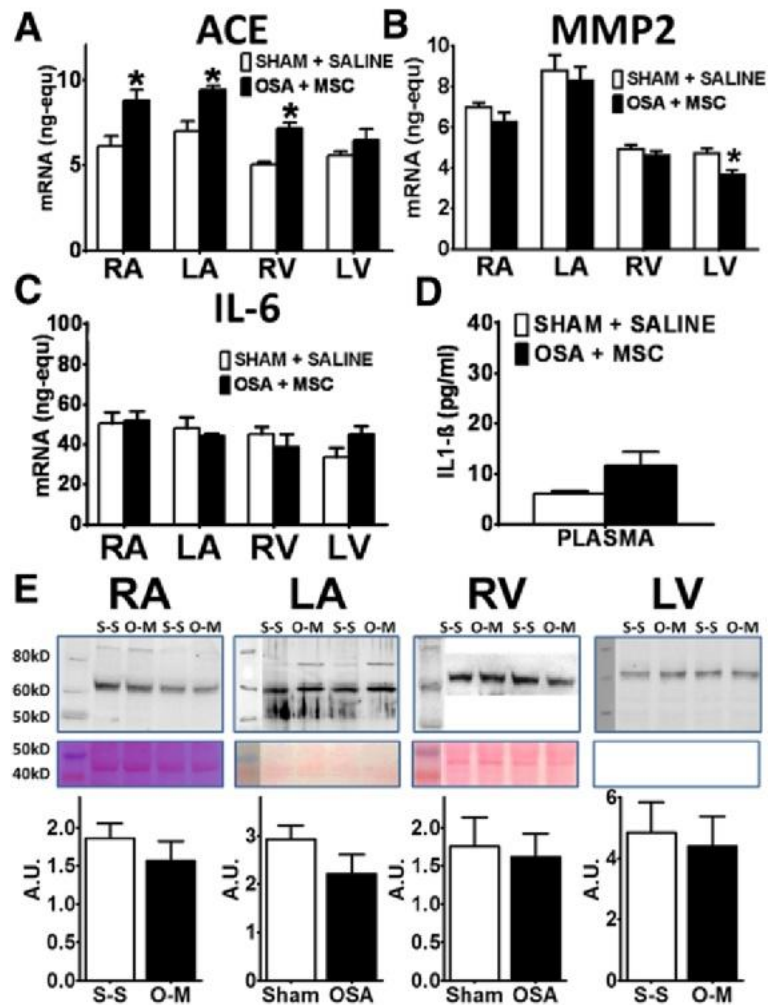
The mechanisms by which OSA induces atrial fibrosis are unknown. Our results are summarized in Figure 10 and yield mechanistic insights. Myocardial collagen content is critically dependent on the balance between synthesis and degradation. In the present OSA-model, both ACE upregulation [32] and MMP-2 downregulation [33] could promote myocardial fibrosis. Nevertheless, further data from our work suggest that MMP-2 is central in OSA-induced atrial fibrosis, while the role of ACE is negligible. First, ACE expression was increased in all cardiac chambers in the OSA-group, but increased fibrosis was only found in the atria. Remarkably, MMP-2 was selectively downregulated in the atria. Second, TGF- $\beta$ 1, an important fibrotic mediator and an ACE downstream mediator, was not increased in OSA-rats. Results after infusion of MSC further emphasize a critical role for MMP2. OSA-rats in the MSC-treated group had an atrial collagen fraction similar to the Sham + S group. This finding was accompanied by a normalization in MMP-2 synthesis, likely leading to a higher extracellular matrix degradation activity and hence, reduced fibrosis. Notably, although MSC infusion prevented atrial fibrosis, it was not able to prevent OSA-induced ACE-increase, thus suggesting that increased ACE expression by itself is not enough to sustain OSA-induced atrial fibrosis.

The expression of the remaining collagen degradation (MMP-3, MMP-9, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2) and collagen cross-linking (LOX) mediators were not affected in our model.

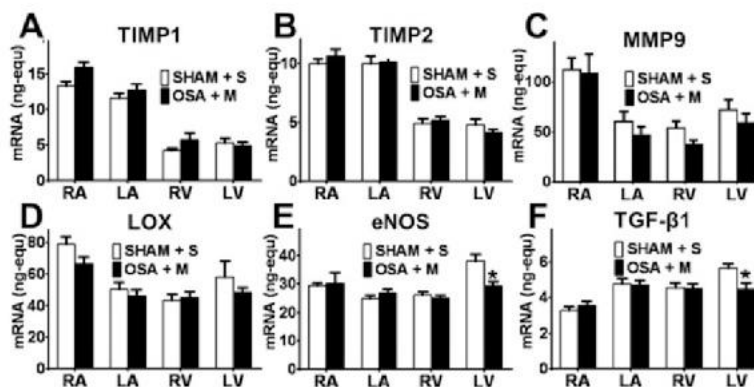
Besides a profibrotic effect, a growing core of evidence points to OSA as a pro-inflammatory disease [34]. Previous work by our group showed that OSA induces a systemic inflammatory response in an acute animal model. This response was characterized by a significant increase in IL-1 $\beta$  plasmatic levels that was prevented by MSC infusion [11]. The results of the present work confirm this finding in a chronic OSA model and show an increase in the pro-inflammatory cytokine IL-6 in both atria and the LV. Inflammation and fibrosis are closely linked, with several interrelated metabolic pathways. For example, IL-6 is involved in the development of myocardial fibrosis in other experimental settings [35]. Moreover, plasma IL-1 $\beta$  selectively correlated to atrial fibrosis intensity, further highlighting higher fibroblast reactivity in the atria than in the LV [31]. Interestingly, both systemic (IL-1 $\beta$ ) and local (IL-6) inflammatory responses were prevented by MSC infusion. Notably, a growing core of evidence is suggesting that an anti-inflammatory effect underlies beneficial effects of MSC [12,36].

Bone marrow MSC properties including pluripotency, avoidance of detection by the host immune system, and ease of expansion in culture make them an attractive option for cell therapy [13,14]. Several studies have shown that MSC transplantation significantly decreases fibrosis in the heart [16,17], lung [37], kidney [38], skin [39] and liver [40]. Although the mechanisms whereby MSCs reduce tissue fibrosis remain unclear, previous studies support our finding that MSC-induced MMP-upregulation might be a hallmark of their antifibrotic effect. In mice skin, Wu et al. [39] demonstrated an antifibrotic effect of bone marrow MSC that was partially mediated by an increased MMP-2 collagen-degradation. Mias et al. [15] showed that MSC injection reduced ventricular fibrosis in a rat model of myocardial infarction by stimulating MMP-2 and MMP-9 secretion in fibroblasts. Consistent with a central role of MMP-2, MSC collagen-accumulation prevention was lost in MMP-2 knock-out fibroblasts [15]. This effect is probably mediated by secreted factors in a paracrine/endocrine mechanism [15,41]. Our data evidenced lack of MSC engrafted in the myocardium and support a systemic effect of MSC in this rat OSA-model.

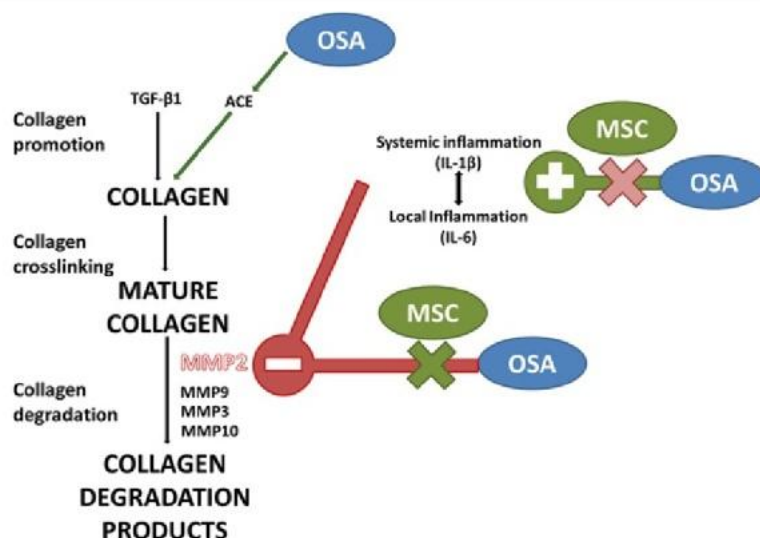
The development of atrial fibrosis in this OSA model might have important clinical implications if confirmed in humans. First, it demonstrates that pro-arrhythmogenic remodeling can be directly caused by OSA and not limited to remodeling induced by other comorbidities such as hypertension, obesity, coronary artery disease, or diabetes, all of which are very prevalent in OSA patients [21]. Accordingly, OSA screening might be important in AF-patients in order to establish a cause for the arrhythmia. Second, it may provide relevant prognostic information, as both OSA and atrial fibrosis predict poor outcomes of



**Figure 8** Assessment of fibrosis mechanisms in OSA + MSC vs Sham + S rats. (A) ACE, (B) MMP-2 and (C) IL-6 mRNA expression (ng-equ) in the four cardiac chambers of Sham + Saline (n = 7) and OSA + MSC (n = 8) rats (Mean ± SEM \*P < 0.05). (D) Plasmatic concentration (pg/mL) of IL-1β in Sham + Saline and OSA + MSC rats (Mean ± SEM \*P < 0.05). (E) MMP-2 protein levels quantification. Representative MMP-2 blots (upper panel), Ponceau-stained membranes (middle panel) and normalized quantification (lower panel) (Mean ± SEM). n = 4-6/group. Left lane is a molecular-weight marker lane; the picture was obtained with visible light. A.U.: Arbitrary Units.



**Figure 9** mRNA expression in the OSA + MSC and Sham + S rats. (A) TIMP-1, (B) TIMP-2, (C) MMP-9, (D) LOX, (E) eNOS and (F) TGF-β1 mRNA expression (ng-equ) in the four cardiac chambers of Sham + Saline (n = 7) and OSA + MSC (n = 8) rats (Mean ± SEM \*P < 0.05).



**Figure 10 Proposed pathophysiology of OSA-induced atrial fibrosis and MSC mechanism of action.** OSA acts as a pro-inflammatory stimulus and inhibits MMP-2 synthesis, reducing collagen degradation and thus favoring collagen accumulation. MSC administration blunts inflammation and normalizes MMP-2 synthesis, thereby increasing collagen degradation and preventing from collagen deposit. OSA also increases ACE expression, but its role in fibrosis promotion is uncertain. Red lines represent inhibition, green lines represent activation. MSC: mesenchymal stem cells. OSA: obstructive sleep apnea.

AF treatments. Finally, as OSA is a treatable disorder, early detection and treatment by means of CPAP or newer therapies may slow AF substrate progression and improve outcomes of antiarrhythmic drugs, electrical cardioversion, or AF ablation. Our results also suggest that MSC might have the potential to prevent the atrial profibrotic remodeling induced by OSA, but its clinical implication in humans needs to be demonstrated.

#### Limitations

Some limitations should be acknowledged and taken into consideration when interpreting our results. First, we lack of electrophysiological and AF inducibility studies and thus, increased inducibility cannot be ensured from our results. However, we show that OSA induces atrial fibrosis, a hallmark of AF and a well-known AF promoter [8], at similar intensity to other reports showing increased inducibility [42]. Second, we assessed protein levels for some genes, including collagen deposit, inflammatory cytokines and MMP-2, but failed to obtain blots for ACE. Third, we only assessed atrial fibrosis as AF substrate; additional studies focusing on atrial dilation or electrical remodeling are warranted.

#### Conclusions

In conclusion, our model demonstrates that OSA induces the development of atrial fibrosis, an arrhythmogenic substrate that might explain the association between OSA and atrial fibrillation. Fibrosis might be

mediated by increased atrial expression of IL-6 and decreased atrial expression of MMP-2 with the subsequent decline in collagen-degradation. This atrial fibrosis is prevented by the intravenous administration of MSC, which normalizes IL-6 and MMP-2 expression.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

LM, IA, JMM, JB, MB and PR: Conceptualized and designed the study. RF, JMM, MT, and IA: Developed and carried out OSA murine model. PR, CR and MB: Performed histological, plasma, mRNA and protein analysis and data interpretation. PR: Performed statistical analysis and wrote the first draft. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

The authors want to thank Neus Portella for editing assistance and Nadia Castillo for her excellent technical help.

#### Funding sources

This work was supported by a grant (PI10/00834) from the Fondo de Investigación Sanitaria and cofinanced by the ISCIII- Subdirección General de Evaluación and the European Regional Development Fund (FEDER); Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-22576); REDINSCOR [V-2006-RET0308-O] and a grant from Hospital Clínic, Barcelona, Catalonia, Spain (Premi Emili Letang to PR).

#### Author details

<sup>1</sup>Thorax Institute, Unitat de Fibril·lació Auricular, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>2</sup>Unitat del Son, Servei Pneumologia, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona IDIBAPS-CIBERES Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>3</sup>Unitat de Biofísica i Bioenginyeria, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona-IDIBAPS-CIBERES, Barcelona, Catalonia, Spain.

Received: 16 October 2013 Accepted: 18 March 2014  
Published: 28 April 2014

## References

- Gami AS, Pressman G, Caples SM, Kanagala R, Gard JJ, Davison DE, Malouf JF, Ammash NM, Friedman PA, Somers VK: **Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea.** *Circulation* 2004, **110**:364–367.
- Gami AS, Hodge DO, Herges RM, Olson EJ, Nykodym J, Kara T, Somers VK: **Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation.** *J Am Coll Cardiol* 2007, **49**:565–571.
- Kanagala R, Murali NS, Friedman PA, Ammash NM, Gersh BJ, Ballman KV, Shamsuzzaman AS, Somers VK: **Obstructive sleep apnea and the recurrence of atrial fibrillation.** *Circulation* 2003, **107**:2589–2594.
- Matiello M, Nadal M, Tamborero D, Berrueto A, Montserrat J, Embid C, Rios J, Villacastin J, Brugada J, Mont L: **Low efficacy of atrial fibrillation ablation in severe obstructive sleep apnoea patients.** *Europace* 2010, **12**:1084–1089.
- Ng CY, Liu T, Shehata M, Stevens S, Chugh SS, Wang X: **Meta-analysis of obstructive sleep apnea as predictor of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation.** *Am J Cardiol* 2011, **108**:47–51.
- Monahan K, Brewster J, Wang L, Parvez B, Goyal S, Roden DM, Darbar D: **Relation of the severity of obstructive sleep apnea in response to anti-arrhythmic drugs in patients with atrial fibrillation or atrial flutter.** *Am J Cardiol* 2012, **110**:369–372.
- Latina JM, Estes NA 3rd, Garlitski AC: **The Relationship between Obstructive Sleep Apnea and Atrial Fibrillation: A Complex Interplay.** *Pulm Med* 2013, **2013**:621736.
- Burstein B, Nattel S: **Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation.** *J Am Coll Cardiol* 2008, **51**:802–809.
- Mahnkopf C, Badger TJ, Burgon NS, Daccarett M, Haslam TS, Badger CT, McGann CJ, Akoum N, Kholmovski E, Macleod RS, Marrouche NF: **Evaluation of the left atrial substrate in patients with lone atrial fibrillation using delayed-enhanced MRI: implications for disease progression and response to catheter ablation.** *Heart Rhythm* 2010, **7**:1475–1481.
- Almendros I, Farre R, Torres M, Bonsignore MR, Dalmases M, Ramirez J, Navajas D, Montserrat JM: **Early and mid-term effects of obstructive apneas in myocardial injury and inflammation.** *Sleep Med* 2011, **12**:1037–1040.
- Carreras A, Almendros I, Montserrat JM, Navajas D, Farre R: **Mesenchymal stem cells reduce inflammation in a rat model of obstructive sleep apnea.** *Respir Physiol Neurobiol* 2010, **172**:210–212.
- Iyer S, Rojas M: **Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies.** *Expert Opin Biol Ther* 2008, **8**:569–581.
- Pittenger MF, Martin BJ: **Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics.** *Circ Res* 2004, **95**:9–20.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: **Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.** *Nature* 2002, **418**:41–49.
- Mias C, Lairez O, Trouche E, Roncalli J, Calise D, Seguelas M, Ordener C, Piercecchi-Marti M, Auge N, Salvayre A, Bourin P, Parini A, Cussac D: **Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion by Cardiac Fibroblasts and Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis After Myocardial Infarction.** *Stem Cells* 2009, **27**:2734–2743.
- Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S: **Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy.** *Circulation* 2005, **112**:1128–1135.
- Li L, Zhang Y, Li Y, Yu B, Xu Y, Zhao S, Guan Z: **Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure.** *Transpl Int* 2008, **21**:1181–1189.
- Almendros I, Carreras A, Montserrat JM, Gozal D, Navajas D, Farre R: **Potential role of adult stem cells in obstructive sleep apnea.** *Front Neurol* 2012, **3**:112.
- Farre R, Nacher M, Serrano-Mollar A, Galdiz JB, Alvarez FJ, Navajas D, Montserrat JM: **Rat model of chronic recurrent airway obstructions to study the sleep apnea syndrome.** *SLEEP* 2007, **30**:930–933.
- Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, Guasch E, Shi Y, Tardif JC, Brugada J, Nattel S, Mont L: **Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training.** *Circulation* 2011, **123**:13–22.
- Kasai T, Floras JS, Bradley TD: **Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: A Bidirectional Relationship.** *Circulation* 2012, **126**:1495–1510.
- Ghias M, Scherlag BJ, Lu Z, Niu G, Moers A, Jackman WM, Lazzara R, Po SS: **The role of ganglionated plexi in apnea-related atrial fibrillation.** *J Am Coll Cardiol* 2075–2083, **2009**:54.
- Lin Z, Schotten U, Neuburger HR, Bohm M, Wirth K: **Negative tracheal pressure during obstructive respiratory events promotes atrial fibrillation by vagal activation.** *Heart Rhythm* 2011, **8**:1436–1443.
- Iwasaki YK, Shi Y, Benito B, Gillis MA, Mizuno K, Tardif JC, Nattel S: **Determinants of atrial fibrillation in an animal model of obesity and acute obstructive sleep apnea.** *Heart Rhythm* 2012, **9**:1409–1416. e1401.
- Simpson JA, Brunt KR, Iscoe S: **Repeated inspiratory occlusions acutely impair myocardial function in rats.** *J Physiol* 2008, **586**:2345–2355.
- Chen L, Zhang J, Gan T, Chen-Lzu Y, Hasday J, Karmazyn M, Balke C, Scharf S: **Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia.** *J Appl Physiol* 2008, **104**:218–223.
- Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S: **Promotion of Atrial Fibrillation by Heart Failure in Dogs: Atrial Remodeling of a Different Sort.** *Circulation* 1999, **100**:87–95.
- Hanna N, Cardin S, Leung TK, Nattel S: **Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure.** *Cardiovasc Res* 2004, **63**:236–244.
- Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, Dittie AS, Dembowski K, Jing S, Field LJ: **Atrial but Not Ventricular Fibrosis in Mice Expressing a Mutant Transforming Growth Factor-1 Transgene in the Heart.** *Circ Res* 2000, **86**:571–579.
- Yue L, Xie J, Nattel S: **Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation.** *Cardiovasc Res* 2011, **89**:744–753.
- Burstein B, Libby E, Calderone A, Nattel S: **Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences.** *Circulation* 2008, **117**:1630–1641.
- Xiao H, Fuchs S, Campbell D, Lewis W, Dudley S, Kasi V, Hoit B, Keshelava G, Zhao H, Capecechi M, Bernstein K: **Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death.** *Am J Pathol* 2004, **165**:1019–1032.
- Van Linthout S, Seeland U, Riad A, Eckhardt O, Hohl M, Dhayat N, Richter U, Fischer JW, Bohm M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschope C: **Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy.** *Basic Res Cardiol* 2008, **103**:319–327.
- Garvey JF, Taylor CT, McNicholas WT: **Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation.** *Eur Respir J* 2009, **33**:1195–1205.
- Melendez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL: **Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats.** *Hypertension* 2010, **56**:225–231.
- van den Akker F, Deddens JC, Doevendans PA, Slijter JP: **Cardiac stem cell therapy to modulate inflammation upon myocardial infarction.** *Biochim Biophys Acta* 1830, **2013**:2449–2458.
- Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG: **Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:8407–8411.
- Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, Huss R, Akis N, Schlondorff D, Anders HJ: **Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice.** *Kidney Int* 2006, **70**:121–129.
- Wu Y, Huang S, Enhe J, Ma K, Yang S, Sun T, Fu X: **Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice.** *Int Wound J*, Published online on 2013 February 5. doi:10.1111/iwj.12034.
- Iwamoto T, Terai S, Hisanaga T, Takami T, Yamamoto N, Watanabe S, Sakaida I: **Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice.** *Cell Tissue Res* 2013, **351**:487–495.
- Mao Q, Lin CX, Liang XL, Gao JS, Xu B: **Mesenchymal stem cells overexpressing integrin-linked kinase attenuate cardiac fibroblast**



## **10 .BIBLIOGRAFIA**



1. <<http://www.alilamedicalmedia.com/-/galleries/image>>
2. <<https://quizlet.com/5980108/patho-ch-13-alterations-in-perfusion-flash-cards/>>
3. Roche, P. L., Filomeno, K. L., Bagchi, R. A. & Czubryt, M. P. Intracellular signaling of cardiac fibroblasts. *Compr. Physiol.* **5**, 721–760 (2015).
4. Porter, K. E. & Turner, N. A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol. Ther.* **123**, 255–278 (2009).
5. Camelliti, P., Borg, T. K. & Kohl, P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* **65**, 40–51 (2005).
6. Kamkin, A. *et al.* Cardiac fibroblasts and the mechano-electric feedback mechanism in healthy and diseased hearts. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **82**, 111–120 (2003).
7. Kohl, P., Camelliti, P., Burton, F. L. & Smith, G. L. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: Relevance for cardiac propagation. *J. Electrocardiol.* **38**, 45–50 (2005).
8. Kohl, P., Bollensdorff, C. & Garny, A. Effects of mechanosensitive ion channels on ventricular electrophysiology: experimental and theoretical models. *Exp. Physiol.* **91**, 307–321 (2006).
9. Rook, M. B. *et al.* Differences in gap junction channels between cardiac myocytes, fibroblasts, and heterologous pairs. *Am. J. Physiol.* **263**, C959–77 (1992).
10. Gaudesius, G., Miragoli, M., Thomas, S. P. & Rohr, S. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ. Res.* **93**, 421–428 (2003).
11. Burstein, B., Libby, E., Calderone, A. & Nattel, S. Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences. *Circulation* **117**, 1630–41 (2008).
12. Rizvi, F. *et al.* Chamber-specific differences in human cardiac fibroblast proliferation and responsiveness toward simvastatin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* ajpcell.00056.2016 (2016). doi:10.1152/ajpcell.00056.2016
13. Yeh, Y.-H. *et al.* Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 mediates the differential responsiveness of atrial versus ventricular fibroblasts to transforming growth factor-beta. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **6**, 790–798 (2013).
14. Halper, J. & Kjaer, M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **802**, 31–47 (2014).
15. Curtis, M. W. & Russell, B. Micromechanical regulation in cardiac myocytes and fibroblasts: implications for tissue remodeling. *Pflugers Arch.* **462**, 105–117 (2011).
16. <<http://www.alilamedicalmedia.com/-/galleries/images-only/heart-and-circulatory-system-images/-/medias/fcee9abe-0855-11e3-98df-ff60acc3e37b-electrical-pathways-of-the-heart-labeled-diagram>>
17. Kern, M. Coronary Blood Flow and Myocardial Ischemia. *Braunwald's Hear. Dis.* **chapter 09**, 1122–1124 (2005).
18. Loscalzo, J. & Epstein, J. 224 Cardiovascular. *Cardiovascular* **14**, 145 (2013).
19. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Crit. Care Med.* **31**, S221–S230 (2003).
20. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* **100**, 158–173 (2007).
21. Vanhoutte, P. M. Endothelial Dysfunction. *Circ. J.* **73**, 595–601 (2009).
22. Shinohara, S., Kihara, T. & Miyake, J. Regulation of Differentiated Phenotypes of Vascular Smooth Muscle Cells. *Curr. Basic Pathol. Approaches to Funct. Muscle Cells Tissues - From Mol. to Humans* 331–343 (2012). doi:10.5772/48573
23. Owens, G. K. *et al.* Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* **84**, 767–801 (2004).
24. Shi, N. & Chen, S.-Y. Smooth Muscle Cell Differentiation: Model Systems, Regulatory Mechanisms, and Vascular Diseases. *J. Cell. Physiol.* n/a-n/a (2015). doi:10.1002/jcp.25208
25. Kelleher, C. M., McLean, S. E. & Mecham, R. P. Vascular extracellular matrix and aortic development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **62**, 153–188 (2004).
26. Williams, J. K. & Heistad, D. D. [The vasa vasorum of the arteries]. *J. Mal. Vasc.* **21 Suppl C**, 266–269 (1996).
27. Majesky, M. W., Dong, X. R., Høglund, V., Mahoney, W. M. J. & Daum, G. The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1530–1539 (2011).
28. Belz, G. G. Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **9**, 73–83 (1995).
29. Kuo, I. Y. & Ehrlich, B. E. Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a006023 (2015).
30. Pintérová, M., Kuneš, J. & Zicha, J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiol. Res.* **60**, 381–402 (2011).
31. Kanagy, N. L. Alpha(2)-adrenergic receptor signalling in hypertension. *Clin. Sci. (Lond)*. **109**, 431–437 (2005).
32. Sartori, C., Lepori, M. & Scherrer, U. Interaction between nitric oxide and the cholinergic and sympathetic nervous system in cardiovascular control in humans. *Pharmacol. Ther.* **106**, 209–220 (2005).
33. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
34. Michel, T. & Vanhoutte, P. M. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* **459**, 807–816 (2010).
35. Walford, G. & Loscalzo, J. Nitric oxide in vascular



- biology. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 2112–2118 (2003).
36. Tousoulis, D., Kampoli, A.-M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N. & Stefanadis, C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **10**, 4–18 (2012).
  37. Brecht, D. S. *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**, 714–718 (1991).
  38. Touyz, R. M. & Berry, C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* **35**, 1001–1015 (2002).
  39. Wynne, B. M., Chiao, C.-W. & Webb, R. C. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens* **3**, 84–95 (2009).
  40. Conti, M. & Beavo, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 481–511 (2007).
  41. Bender, A. T. & Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev.* **58**, 488–520 (2006).
  42. Li, Z. *et al.* A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell* **112**, 77–86 (2003).
  43. Francis, S. H., Busch, J. L., Corbin, J. D. & Sibley, D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol. Rev.* **62**, 525–563 (2010).
  44. Kemp-Harper, B. & Schmidt, H. H. H. W. cGMP in the vasculature. *Handb. Exp. Pharmacol.* 447–467 (2009). doi:10.1007/978-3-540-68964-5\_19
  45. Lukowski, R., Krieg, T., Rybalkin, S. D., Beavo, J. & Hofmann, F. Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunctions: Boom, bust, and beyond. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 404–413 (2014).
  46. Gamidov, S. I., Ovchinnikov, R. I. & Popov, A. I. [Sildenafil citrate in the treatment of men with erectile dysfunction]. *Urologiia* 99-100-103 (2014).
  47. Chapman, T. H., Wilde, M., Sheth, A. & Madden, B. P. Sildenafil therapy in secondary pulmonary hypertension: Is there benefit in prolonged use? *Vascul. Pharmacol.* **51**, 90–95 (2009).
  48. Lewis, G. D. *et al.* Sildenafil improves exercise hemodynamics and oxygen uptake in patients with systolic heart failure. *Circulation* **115**, 59–66 (2007).
  49. Guazzi, M. Clinical use of phosphodiesterase-5 inhibitors in chronic heart failure. *Circ. Heart Fail.* **1**, 272–280 (2008).
  50. Behling, A. *et al.* Effects of 5'-phosphodiesterase four-week long inhibition with sildenafil in patients with chronic heart failure: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Card. Fail.* **14**, 189–197 (2008).
  51. Bocchi, E. A. *et al.* Sildenafil effects on exercise, neurohormonal activation, and erectile dysfunction in congestive heart failure: a double-blind, placebo-controlled, randomized study followed by a prospective treatment for erectile dysfunction. *Circulation* **106**, 1097–1103 (2002).
  52. Guazzi, M., Samaja, M., Arena, R., Vicenzi, M. & Guazzi, M. D. Long-term use of sildenafil in the therapeutic management of heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 2136–2144 (2007).
  53. Ockaili, R., Salloum, F., Hawkins, J. & Kukreja, R. C. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H1263-9 (2002).
  54. Takimoto, E. *et al.* Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **11**, 214–222 (2005).
  55. Zhang, M. *et al.* Myocardial remodeling is controlled by myocyte-targeted gene regulation of phosphodiesterase type 5. *J. Am. Coll. Cardiol.* **56**, 2021–2030 (2010).
  56. Lu, Z. *et al.* Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. *Circulation* **121**, 1474–1483 (2010).
  57. Nagendran, J. *et al.* Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* **116**, 238–48 (2007).
  58. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, A. S. Clinical Cardiology: New Frontiers Global Burden of Cardiovascular Diseases. *Circulation* **104**, 2746–2753 (2001).
  59. WHO | Cardiovascular diseases (CVDs).
  60. Mozaffarian, D. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **133**, e38-360 (2016).
  61. Gibbons, G. H. & Dzau, V. J. The emerging concept of vascular remodeling. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1431–1438 (1994).
  62. Renna, N. F., de Las Heras, N. & Miatello, R. M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int. J. Hypertens.* **2013**, 808353 (2013).
  63. Intengan, H. D. & Schiffrin, E. L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **38**, 581–587 (2001).
  64. Galis, Z. S. & Khatri, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* **90**, 251–262 (2002).
  65. Muniyappa, R. & Sowers, J. R. Role of Insulin Resistance in Endothelial Dysfunction. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **14**, 5–12 (2013).
  66. Frostegård, J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med.* **11**, 117 (2013).
  67. Sorensen, K. E. *et al.* Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J. Clin. Invest.* **93**, 50–55 (1994).
  68. Libby, P., Tabas, I., Fredman, G. & Fisher, E. Inflammation and its resolution as determinants of

- acute coronary syndromes. *Circ. Res.* **114**, 1867–1879 (2014).
69. Ray, P., Huang, B. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* **24**, 981–990 (2012).
  70. Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H. & Beckman, J. S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 834–842 (1992).
  71. Benson, M. A. *et al.* A Pivotal Role for Tryptophan 447 in Enzymatic Coupling of Human Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS): EFFECTS ON TETRAHYDROBIOPTERIN-DEPENDENT CATALYSIS AND eNOS DIMERIZATION. *J. Biol. Chem.* **288**, 29836–29845 (2013).
  72. Bendall, J. K., Douglas, G., McNeill, E., Channon, K. M. & Crabtree, M. J. Tetrahydrobiopterin in Cardiovascular Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 3040–3077 (2014).
  73. Verma, S. *et al.* A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* **106**, 913–919 (2002).
  74. Dzau, V. J. & Gibbons, G. H. Vascular remodeling: mechanisms and implications. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **21 Suppl 1**, S1-5 (1993).
  75. Orlandi, A., Mauriello, A., Marino, B. & Spagnoli, L. G. Age-related modifications of aorta and coronaries in the rabbit: a morphological and morphometrical assessment. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **17**, 37–53 (1993).
  76. Spina, M., Garbisa, S., Hinnie, J., Hunter, J. C. & Serafini-Fracassini, A. Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis* **3**, 64–76 (1983).
  77. Atkinson, J. [Aging of arterial extracellular matrix elastin: etiology and consequences]. *Pathol. Biol. (Paris)*. **46**, 555–559 (1998).
  78. Henaut, L. *et al.* [Pathophysiological mechanisms of vascular calcification]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. **73**, 271–287 (2015).
  79. Li, Z., Cheng, H., Lederer, W. J., Froehlich, J. & Lakatta, E. G. Enhanced proliferation and migration and altered cytoskeletal proteins in early passage smooth muscle cells from young and old rat aortic explants. *Exp. Mol. Pathol.* **64**, 1–11 (1997).
  80. Ruiz-Torres, A., Lozano, R., Melon, J. & Carraro, R. Age-dependent decline of in vitro migration (basal and stimulated by IGF-1 or insulin) of human vascular smooth muscle cells. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **58**, B1074-7 (2003).
  81. Coll-Bonfill, N., de la Cruz-Thea, B., Pisano, M. V. & Musri, M. M. Noncoding RNAs in smooth muscle cell homeostasis: implications in phenotypic switch and vascular disorders. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 1071–1087 (2016). doi:10.1007/s00424-016-1821-x
  82. McDonald, R. A. *et al.* miRNA-21 is dysregulated in response to vein grafting in multiple models and genetic ablation in mice attenuates neointima formation. *Eur. Heart J.* **34**, 1636–1643 (2013).
  83. Torella, D. *et al.* MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo. *Circ. Res.* **109**, 880–893 (2011).
  84. Boettger, T. *et al.* Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J. Clin. Invest.* **119**, 2634–2647 (2009).
  85. Cordes, K. R. *et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* **460**, 705–710 (2009).
  86. Patel, A. K. *et al.* A Review on Atherosclerotic Biology, Wall Stiffness, Physics of Elasticity, and Its Ultrasound-Based Measurement. *Curr. Atheroscler. Rep.* **18**, 83 (2016).
  87. Raines, E. W. & Ferri, N. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J. Lipid Res.* **46**, 1081–1092 (2005).
  88. Eghbali, M., Wang, Y., Toro, L. & Stefani, E. Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends Cardiovasc. Med.* **16**, 285–291 (2006).
  89. Fagard, R. ATHLETE'S HEART. *Heart* **89**, 1455–1461 (2003).
  90. Weeks, K. L. & McMullen, J. R. The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology (Bethesda)*. **26**, 97–105 (2011).
  91. Van Berlo, J. H., Maillet, M. & Molkentin, J. D. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J. Clin. Invest.* **123**, 37–45 (2013).
  92. Maillet, M., van Berlo, J. H. & Molkentin, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 38–48 (2013).
  93. Lyon, R. C., Zanella, F., Omens, J. H. & Sheikh, F. Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circ. Res.* **116**, 1462–1476 (2015).
  94. Dorn, G. W. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* **49**, 962–70 (2007).
  95. Yayama, K. *et al.* Up-regulation of angiotensin II type 2 receptor in rat thoracic aorta by pressure-overload. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 736–743 (2004).
  96. Rapacciuolo, A. *et al.* Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **38**, 876–882 (2001).
  97. Creemers, E. E. & Pinto, Y. M. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc. Res.* **89**, 265–272 (2011).
  98. Azibani, F., Fazal, L., Chatziantoniou, C., Samuel, J.-L. & Delcayre, C. Aldosterone mediates cardiac fibrosis in the setting of hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **15**, 395–400 (2013).
  99. Segura, A. M., Frazier, O. H. & Buja, L. M. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail. Rev.* **19**, 173–185

- (2014).
100. Leask, A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ. Res.* **106**, 1675–1680 (2010).
  101. Schroer, A. K. & Merryman, W. D. Mechanobiology of myofibroblast adhesion in fibrotic cardiac disease. *J. Cell Sci.* **128**, 1865–1875 (2015).
  102. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **16**, 585–601 (2008).
  103. Leask, A. Getting to the heart of the matter: new insights into cardiac fibrosis. *Circ. Res.* **116**, 1269–1276 (2015).
  104. Lim, H. & Zhu, Y. Z. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2584–96 (2006).
  105. Weber, K. T. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* **96**, 4065–4082 (1997).
  106. Hao, J., Wang, B., Jones, S. C., Jassal, D. S. & Dixon, I. M. Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H3020-30 (2000).
  107. Burstein, B. & Nattel, S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 802–809 (2008).
  108. Martos, R. *et al.* Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation* **115**, 888–895 (2007).
  109. Karagueuzian, H. S. Targeting cardiac fibrosis: a new frontier in antiarrhythmic therapy? *Am. J. Cardiovasc. Dis.* **1**, 101–109 (2011).
  110. Rohr, S. Myofibroblasts in diseased hearts: new players in cardiac arrhythmias? *Heart Rhythm* **6**, 848–856 (2009).
  111. Dzeshka, M. S., Lip, G. Y. H., Snezhitskiy, V. & Shantsila, E. Cardiac Fibrosis in Patients With Atrial Fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 943–959 (2015).
  112. Yue, L., Xie, J. & Nattel, S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **89**, 744–753 (2011).
  113. Coen, M., Gabbiani, G. & Bochaton-Piallat, M.-L. Myofibroblast-mediated adventitial remodeling: an underestimated player in arterial pathology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2391–2396 (2011).
  114. Youn, H.-J. *et al.* Relation between flow reserve capacity of penetrating intramyocardial coronary arteries and myocardial fibrosis in hypertension: study using transthoracic Doppler echocardiography. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **19**, 373–378 (2006).
  115. Lewis, T. ELECTRO-CARDIOGRAPHY AND ITS IMPORTANCE IN THE CLINICAL EXAMINATION OF HEART AFFECTIONS. *Br. Med. J.* **2**, 65–67 (1912).
  116. Lewis, T. A Lecture ON THE EVIDENCES OF AURICULAR FIBRILLATION, TREATED HISTORICALLY: Delivered at University College Hospital. *Br. Med. J.* **1**, 57–60 (1912).
  117. Andrade, J., Khairy, P., Dobrev, D. & Nattel, S. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: Relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ. Res.* **114**, 1453–1468 (2014).
  118. Fox, C. S. *et al.* Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *JAMA* **291**, 2851–2855 (2004).
  119. Frost, L. & Vestergaard, P. [Alcohol consumption and the risk of atrial fibrillation or flutter--secondary publication. A cohort study]. *Ugeskr. Laeger* **167**, 3308–3310 (2005).
  120. Mukamal, K. J., Tolstrup, J. S., Friberg, J., Jensen, G. & Gronbaek, M. Alcohol consumption and risk of atrial fibrillation in men and women: the Copenhagen City Heart Study. *Circulation* **112**, 1736–1742 (2005).
  121. Heeringa, J., Kors, J. A., Hofman, A., van Rooij, F. J. A. & Witteman, J. C. M. Cigarette smoking and risk of atrial fibrillation: the Rotterdam Study. *Am. Heart J.* **156**, 1163–1169 (2008).
  122. Chamberlain, A. M. *et al.* Smoking and incidence of atrial fibrillation: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Heart Rhythm* **8**, 1160–1166 (2011).
  123. Gami, A. S. *et al.* Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 565–571 (2007).
  124. Gami, A. S. *et al.* Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea. *Circulation* **110**, 364–367 (2004).
  125. Calvo, N. *et al.* Emerging risk factors and the dose-response relationship between physical activity and lone atrial fibrillation: a prospective case-control study. *Eur. Eur. pacing, arrhythmias, Card. Electrophysiol. J. Work. groups Card. pacing, arrhythmias, Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* **18**, 57–63 (2016).
  126. Mehra, R. *et al.* Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 910–916 (2006).
  127. Fein, A. S. *et al.* Treatment of obstructive sleep apnea reduces the risk of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 300–305 (2013).
  128. Karjalainen, J., Kujala, U. M., Kaprio, J., Sarna, S. & Viitasalo, M. Lone atrial fibrillation in vigorously exercising middle aged men: case-control study. *BMJ* **316**, 1784–1785 (1998).
  129. Molina, L. *et al.* Long-term endurance sport practice increases the incidence of lone atrial fibrillation in men: a follow-up study. *Eur. Eur. pacing, arrhythmias, Card. Electrophysiol. J. Work. groups Card. pacing, arrhythmias, Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* **10**, 618–623 (2008).
  130. Grimsmo, J., Grundvold, I., Maehlum, S. & Arnesen, H. High prevalence of atrial fibrillation in long-term endurance cross-country skiers: echocardiographic

- findings and possible predictors--a 28-30 years follow-up study. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **17**, 100–105 (2010).
131. Pelliccia, A. *et al.* Prevalence and clinical significance of left atrial remodeling in competitive athletes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 690–696 (2005).
  132. Guasch, E. & Stoll, M. *Consensus.* **14**, (2015).
  133. Nattel, S. & Harada, M. Atrial remodeling and atrial fibrillation: Recent advances and translational perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 2335–2345 (2014).
  134. Lee, K. W. *et al.* Pirfenidone prevents the development of a vulnerable substrate for atrial fibrillation in a canine model of heart failure. *Circulation* **114**, 1703–1712 (2006).
  135. Wijesurendra, R. S. & Casadei, B. Atrial fibrillation: effects beyond the atrium? *Cardiovasc. Res.* **105**, 238–247 (2015).
  136. Tang, M., Zhang, S., Sun, Q. & Huang, C. Alterations in electrophysiology and tissue structure of the left atrial posterior wall in a canine model of atrial fibrillation caused by chronic atrial dilatation. *Circ. J.* **71**, 1636–1642 (2007).
  137. Zou, R., Kneller, J., Leon, L. J. & Nattel, S. Substrate size as a determinant of fibrillatory activity maintenance in a mathematical model of canine atrium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H1002-12 (2005).
  138. Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P. & Goette, A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol. Rev.* **91**, 265–325 (2011).
  139. Balse, E. *et al.* Dynamic of ion channel expression at the plasma membrane of cardiomyocytes. *Physiol. Rev.* **92**, 1317–1358 (2012).
  140. de Vos, C. B. *et al.* Autonomic trigger patterns and anti-arrhythmic treatment of paroxysmal atrial fibrillation: data from the Euro Heart Survey. *Eur. Heart J.* **29**, 632–639 (2008).
  141. Shen, M. J. *et al.* Continuous low-level vagus nerve stimulation reduces stellate ganglion nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmias in ambulatory canines. *Circulation* **123**, 2204–2212 (2011).
  142. Vigmond, E. J. *et al.* The effect of vagally induced dispersion of action potential duration on atrial arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* **1**, 334–344 (2004).
  143. Chugh, S. S., Roth, G. A., Gillum, R. F. & Mensah, G. A. Global burden of atrial fibrillation in developed and developing nations. *Glob. Heart* **9**, 113–119 (2014).
  144. Nattel, S. Decade in review--arrhythmias: Cardiac fibrillation--challenges and evolving solutions. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 626–7 (2014).
  145. Marzona, I. *et al.* Increased risk of cognitive and functional decline in patients with atrial fibrillation: results of the ONTARGET and TRANSCEND studies. *CMAJ* **184**, E329–36 (2012).
  146. Wolf, P. A., Abbott, R. D. & Kannel, W. B. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* **22**, 983–988 (1991).
  147. Benjamin, E. J. *et al.* Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* **98**, 946–952 (1998).
  148. KANNEL, W. B., DAWBER, T. R., KAGAN, A., REVOTSKIE, N. & STOKES, J. 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **55**, 33–50 (1961).
  149. Mendis, S., Puska, P. & Norrving, B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. *World Heal. Organ.* 2–14 (2011).
  150. Perk, J. *et al.* European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by re. *Atherosclerosis* **223**, 1–68 (2012).
  151. O'Donnell, C. J. & Elosua, R. Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study. *Rev. Española Cardiol. (English Ed.)* **61**, 299–310 (2008).
  152. Hacman, D. G. & Anand, S. S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review. *Clin. Cardiol.* **290**, (2003).
  153. Services, U. S. D. O. H. A. H. Physical Activity and Health: A Report of the Surgeon General. *Rev. Prat.* **60**, 1996 (1996).
  154. Oguma, Y. & Shinoda-Tagawa, T. Physical activity decreases cardiovascular disease risk in women: review and meta-analysis. *Am. J. Prev. Med.* **26**, 407–418 (2004).
  155. Greaves, C. J. *et al.* Systematic review of reviews of intervention components associated with increased effectiveness in dietary and physical activity interventions. *BMC Public Health* **11**, 119 (2011).
  156. Wendel-Vos, G. C. W. *et al.* Physical activity and stroke. A meta-analysis of observational data. *Int. J. Epidemiol.* **33**, 787–798 (2004).
  157. Wannamethee, S. G., Shaper, A. G. & Walker, M. Changes in physical activity, mortality, and incidence of coronary heart disease in older men. *Lancet (London, England)* **351**, 1603–1608 (1998).
  158. Wannamethee, S. G. & Shaper, A. G. Physical activity in the prevention of cardiovascular disease: an epidemiological perspective. *Sports Med.* **31**, 101–114 (2001).
  159. Durstine, J. L. *et al.* Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise: a quantitative analysis. *Sports Med.* **31**, 1033–1062 (2001).
  160. Halverstadt, A., Phares, D. A., Wilund, K. R., Goldberg, A. P. & Hagberg, J. M. Endurance exercise training raises high-density lipoprotein cholesterol and lowers small low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein independent of body fat phenotypes in older men and women. *Metabolism.* **56**, 444–450 (2007).
  161. Parker, L. *et al.* Acute High-Intensity Interval Exercise-Induced Redox Signaling Is Associated with Enhanced Insulin Sensitivity in Obese Middle-Aged Men. *Front. Physiol.* **7**, 411 (2016).

162. Wang, H.-J., Yang, H.-T. & Chen, W. Swimming exercise reduces preference for a high-fat diet by increasing insulin sensitivity in C57BL/6 mice. *Neuroreport* **28**, 56–61 (2017).
163. Maiorana, A., O'Driscoll, G., Taylor, R. & Green, D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med.* **33**, 1013–1035 (2003).
164. Warnberg, J., Cunningham, K., Romeo, J. & Marcos, A. Physical activity, exercise and low-grade systemic inflammation. *Proc. Nutr. Soc.* **69**, 400–406 (2010).
165. El-Sayed, M. S. Exercise and training effects on platelets in health and disease. *Platelets* **13**, 261–266 (2002).
166. Cassilhas, R. C., Tufik, S. & de Mello, M. T. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 975–983 (2016).
167. Friedenreich, C. M., Neilson, H. K., Farris, M. S. & Courneya, K. S. Physical Activity and Cancer Outcomes: A Precision Medicine Approach. *Clin. Cancer Res.* **22**, 4766–4775 (2016).
168. Castrogiovanni, P. *et al.* The importance of physical activity in osteoporosis. From the molecular pathways to the clinical evidence. *Histol. Histopathol.* **31**, 1183–1194 (2016).
169. Sharma, S., Merghani, A. & Mont, L. Exercise and the heart: the good, the bad, and the ugly. *Eur. Heart J.* (2015). doi:10.1093/eurheartj/ehv090
170. Tursky, E. A. Muscle training: physiology and practical applications of training for strength versus endurance. *Orthop. Nurs.* **10**, 27–32 (1991).
171. Prasad, D. & Das, B. Physical Inactivity: a Cardiovascular Risk Factor. *Indian J. Med. Sci.* **63**, 33–43 (2009).
172. Kiens, B., Essen-Gustavsson, B., Christensen, N. J. & Saltin, B. Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J. Physiol.* **469**, 459–478 (1993).
173. Franchini, E. Response to beneke and hoos. *Int. J. Sports Physiol. Perform.* **7**, 308–309 (2012).
174. Bassett, D. R. J. & Howley, E. T. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**, 70–84 (2000).
175. OMS | ¿Qué se entiende por actividad moderada y actividad vigorosa?
176. Mcardle, W. D., Katch, F. I. & Katch, V. L. Transferencia energética durante el ejercicio en el ser humano. *Fundam. Fisiol. del Ejerc.* 128–146 (2004).
177. Haskell, W. L. *et al.* Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**, 1423–1434 (2007).
178. Arem, H. *et al.* Leisure Time Physical Activity and Mortality: A Detailed Pooled Analysis of the Dose-Response Relationship. *JAMA Intern. Med.* **20892**, 959–967 (2015).
179. Who, W. H. O. Global recommendations on physical activity for health. *Geneva World Heal. Organ.* **60** (2010). doi:10.1080/11026480410034349
180. Pate, R. R. *et al.* Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA* **273**, 402–407 (1995).
181. Vandenberg, A. E. *et al.* Walking and Walkability: Is Wayfinding a Missing Link? Implications for Public Health Practice. *J. Phys. Act. Health* (2015). doi:10.1123/jpah.2014-0577
182. Nelson, M. E. *et al.* Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**, 1435–1445 (2007).
183. Wen, C. P. *et al.* Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet (London, England)* **378**, 1244–1253 (2011).
184. Arem, H. *et al.* Leisure time physical activity and mortality: a detailed pooled analysis of the dose-response relationship. *JAMA Intern. Med.* **175**, 959–967 (2015).
185. Lee, D.-C. *et al.* Leisure-time running reduces all-cause and cardiovascular mortality risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**, 472–481 (2014).
186. DeMaria, A. N., Neumann, A., Schubart, P. J., Lee, G. & Mason, D. T. Systematic correlation of cardiac chamber size and ventricular performance determined with echocardiography and alterations in heart rate in normal persons. *Am. J. Cardiol.* **43**, 1–9 (1979).
187. Ehsani, A. A., Hagberg, J. M. & Hickson, R. C. Rapid changes in left ventricular dimensions and mass in response to physical conditioning and deconditioning. *Am. J. Cardiol.* **42**, 52–56 (1978).
188. Dixon, E. M., Kamath, M. V., McCartney, N. & Fallen, E. L. Neural regulation of heart rate variability in endurance athletes and sedentary controls. *Cardiovasc. Res.* **26**, 713–719 (1992).
189. TIPTON, C. M. & TAYLOR, B. INFLUENCE OF ATROPINE ON HEART RATES OF RATS. *Am. J. Physiol.* **208**, 480–484 (1965).
190. Katona, P. G., McLean, M., Dighton, D. H. & Guz, A. Sympathetic and parasympathetic cardiac control in athletes and nonathletes at rest. *J. Appl. Physiol.* **52**, 1652–1657 (1982).
191. Barney, J. A. *et al.* Carotid baroreflex responsiveness in high-fit and sedentary young men. *J. Appl. Physiol.* **65**, 2190–2194 (1988).
192. Mitchell, J. H. & Wildenthal, K. Static (isometric) exercise and the heart: physiological and clinical considerations. *Annu. Rev. Med.* **25**, 369–381 (1974).
193. Zhong, L., Ghista, D. N. & Tan, R. S. Left ventricular wall stress compendium. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **15**, 1015–41 (2012).
194. Kemi, O. J., Loennechen, J. P., Wisloff, U. & Ellingsen, O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* **93**, 1301–1309 (2002).
195. Jin, H. *et al.* Effects of exercise training on cardiac

- function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H2994-3002 (2000).
196. Waring, C. D. *et al.* The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. *Eur. Heart J.* **35**, 2722–2731 (2014).
  197. Missault, L. *et al.* Cardiac anatomy and diastolic filling in professional road cyclists. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **66**, 405–408 (1993).
  198. Pelliccia, A., Maron, B. J., Spataro, A., Proschan, M. A. & Spirito, P. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *N. Engl. J. Med.* **324**, 295–301 (1991).
  199. Pelliccia, A., Maron, B. J., Culasso, F., Spataro, A. & Caselli, G. Athlete's heart in women. Echocardiographic characterization of highly trained elite female athletes. *JAMA* **276**, 211–215 (1996).
  200. Spirito, P. *et al.* Morphology of the 'athlete's heart' assessed by echocardiography in 947 elite athletes representing 27 sports. *Am. J. Cardiol.* **74**, 802–806 (1994).
  201. Fagard, R. H. Athlete's heart: A meta-analysis of the echocardiographic experience. *Int. J. Sports Med.* **17 Suppl 3**, S140-4 (1996).
  202. Scharhag, J. *et al.* Athlete's heart: right and left ventricular mass and function in male endurance athletes and untrained individuals determined by magnetic resonance imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 1856–1863 (2002).
  203. Pluim, B. M. *et al.* Comparison of echocardiography with magnetic resonance imaging in the assessment of the athlete's heart. *Eur. Heart J.* **18**, 1505–1513 (1997).
  204. D'Andrea, A. *et al.* Left atrial myocardial function in either physiological or pathological left ventricular hypertrophy: a two-dimensional speckle strain study. *Br. J. Sports Med.* **42**, 696–702 (2008).
  205. Scharf, M. *et al.* Cardiac magnetic resonance assessment of left and right ventricular morphologic and functional adaptations in professional soccer players. *Am. Heart J.* **159**, 911–918 (2010).
  206. La Gerche, A. *et al.* Exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodelling in endurance athletes. *Eur. Heart J.* **33**, 998–1006 (2012).
  207. Oxborough, D. *et al.* The right ventricle of the endurance athlete: the relationship between morphology and deformation. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **25**, 263–271 (2012).
  208. Maron, B. J. Structural features of the athlete heart as defined by echocardiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* **7**, 190–203 (1986).
  209. Ekblom, B. & Hermansen, L. Cardiac output in athletes. *J. Appl. Physiol.* **25**, 619–625 (1968).
  210. Higginbotham, M. B. *et al.* Regulation of stroke volume during submaximal and maximal upright exercise in normal man. *Circ. Res.* **58**, 281–291 (1986).
  211. Gledhill, N., Cox, D. & Jamnik, R. Endurance athletes' stroke volume does not plateau: major advantage is diastolic function. *Med. Sci. Sports Exerc.* **26**, 1116–1121 (1994).
  212. Fagard, R. H. Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiol. Clin.* **15**, 397–412 (1997).
  213. Fagard, R., Van den Broeke, C. & Amery, A. Left ventricular dynamics during exercise in elite marathon runners. *J. Am. Coll. Cardiol.* **14**, 112–118 (1989).
  214. Brandao, M. U. *et al.* Left ventricular function during dynamic exercise in untrained and moderately trained subjects. *J. Appl. Physiol.* **75**, 1989–1995 (1993).
  215. Laughlin, M. H., Bowles, D. K. & Duncker, D. J. The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* **302**, H10-23 (2012).
  216. White, F. C., Bloor, C. M., McKirnan, M. D. & Carroll, S. M. Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *J. Appl. Physiol.* **85**, 1160–1168 (1998).
  217. Laughlin, M. H. Endothelium-mediated control of coronary vascular tone after chronic exercise training. *Med. Sci. Sports Exerc.* **27**, 1135–1144 (1995).
  218. Pelliccia, A. *et al.* Coronary arteries in physiological hypertrophy: echocardiographic evidence of increased proximal size in elite athletes. *Int. J. Sports Med.* **11**, 120–126 (1990).
  219. Haskell, W. L. *et al.* Coronary artery size and dilating capacity in ultradistance runners. *Circulation* **87**, 1076–1082 (1993).
  220. CURENS, J. H. & WHITE, P. D. Half a century of running. Clinical, physiologic and autopsy findings in the case of Clarence DeMar ('Mr. Marathon'). *N. Engl. J. Med.* **265**, 988–993 (1961).
  221. Rose, G., Prineas, R. J. & Mitchell, J. R. Myocardial infarction and the intrinsic calibre of coronary arteries. *Br. Heart J.* **29**, 548–552 (1967).
  222. Zeppilli, P. *et al.* Echocardiographic size of conductance vessels in athletes and sedentary people. *Int. J. Sports Med.* **16**, 38–44 (1995).
  223. Schmidt-Trucksass, A. *et al.* Arterial properties of the carotid and femoral artery in endurance-trained and paraplegic subjects. *J. Appl. Physiol.* **89**, 1956–1963 (2000).
  224. Dinunno, F. A. *et al.* Regular endurance exercise induces expansive arterial remodelling in the trained limbs of healthy men. *J. Physiol.* **534**, 287–295 (2001).
  225. Huonker, M., Schmid, A., Schmidt-Trucksass, A., Grathwohl, D. & Keul, J. Size and blood flow of central and peripheral arteries in highly trained able-bodied and disabled athletes. *J. Appl. Physiol.* **95**, 685–691 (2003).
  226. Wyatt, H. L. & Mitchell, J. Influences of physical conditioning and deconditioning on coronary vasculature of dogs. *J. Appl. Physiol.* **45**, 619–625 (1978).
  227. Lash, J. M. & Bohlen, H. G. Functional adaptations of rat skeletal muscle arterioles to aerobic exercise training. *J. Appl. Physiol.* **72**, 2052–2062 (1992).

228. Kramsch, D. M., Aspen, A. J., Abramowitz, B. M., Kreimendahl, T. & Hood, W. B. J. Reduction of coronary atherosclerosis by moderate conditioning exercise in monkeys on an atherogenic diet. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1483–1489 (1981).
229. Hoier, B. & Hellsten, Y. Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation* **21**, 301–314 (2014).
230. Haas, T. L. & Nwadozi, E. Regulation of skeletal muscle capillary growth in exercise and disease. *Appl. Physiol. Nutr. Metab. = Physiol. Appl. Nutr. Metab.* **40**, 1221–1232 (2015).
231. Convertino, V. A. Blood volume response to physical activity and inactivity. *Am. J. Med. Sci.* **334**, 72–79 (2007).
232. van Hall, G. The Physiological Regulation of Skeletal Muscle Fatty Acid Supply and Oxidation During Moderate-Intensity Exercise. *Sports Med.* **45 Suppl 1**, S23–32 (2015).
233. Joyner, M. J. & Casey, D. P. Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs. *Physiol. Rev.* **95**, 549–601 (2015).
234. Convertino, V. A. Blood volume: its adaptation to endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* **23**, 1338–1348 (1991).
235. Cornelissen, V. A. & Fagard, R. H. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **46**, 667–675 (2005).
236. Borjesson, M., Onerup, A., Lundqvist, S. & Dahlof, B. Physical activity and exercise lower blood pressure in individuals with hypertension: narrative review of 27 RCTs. *Br. J. Sports Med.* **50**, 356–361 (2016).
237. Lin, X.-Y., Wang, L., Zhu, D.-B., Xu, Y.-H. & Wang, J.-F. [The effect of different intensity aerobic exercise training on blood pressure control in hypertensive patients.]. *Zhonghua nei ke za zhi* **48**, 1023–1025 (2009).
238. Boutcher, Y. N. & Boutcher, S. H. Exercise intensity and hypertension: what's new? *J. Hum. Hypertens.* (2016). doi:10.1038/jhh.2016.62
239. Pate, R. R. Physical activity and health: dose-response issues. *Res. Q. Exerc. Sport* **66**, 313–317 (1995).
240. Arroll, B. & Beaglehole, R. Does physical activity lower blood pressure: a critical review of the clinical trials. *J. Clin. Epidemiol.* **45**, 439–447 (1992).
241. Jorgensen, C. R., Gobel, F. L., Taylor, H. L. & Wang, Y. Myocardial blood flow and oxygen consumption during exercise. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **301**, 213–223 (1977).
242. Schabort, E. J., Killian, S. C., St Clair Gibson, A., Hawley, J. A. & Noakes, T. D. Prediction of triathlon race time from laboratory testing in national triathletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**, 844–849 (2000).
243. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion CDC. CHAPTER 3: Physiologic Responses and Long-Term Adaptations to Exercise. *Phys. Act. Heal. A Rep. Surg. Gen.* 61–77 (1999).
244. Clarke, J., de Lannoy, L. & Ross, R. Comparison of Measures of Maximal and Submaximal Fitness in Response to Exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* (2016). doi:10.1249/MSS.0000000000001164
245. Wilson, M. G., Ellison, G. M. & Cable, N. T. Basic science behind the cardiovascular benefits of exercise. *Br. J. Sports Med.* **50**, 93–99 (2016).
246. Whyte, G. P. *et al.* Left ventricular morphology and function in female athletes: a meta-analysis. *Int. J. Sports Med.* **25**, 380–383 (2004).
247. Sun, B., Ma, J. Z., Yong, Y. H. & Lv, Y. Y. The upper limit of physiological cardiac hypertrophy in elite male and female athletes in China. *Eur. J. Appl. Physiol.* **101**, 457–463 (2007).
248. George, K. P., Wolfe, L. A., Burggraf, G. W. & Norman, R. Electrocardiographic and echocardiographic characteristics of female athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* **27**, 1362–1370 (1995).
249. Basavarajaiah, S. *et al.* Ethnic differences in left ventricular remodeling in highly-trained athletes relevance to differentiating physiologic left ventricular hypertrophy from hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 2256–2262 (2008).
250. Rawlins, J. *et al.* Ethnic differences in physiological cardiac adaptation to intense physical exercise in highly trained female athletes. *Circulation* **121**, 1078–1085 (2010).
251. Morganroth, J., Maron, B. J., Henry, W. L. & Epstein, S. E. Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann. Intern. Med.* **82**, 521–524 (1975).
252. D'Andrea, A. *et al.* Range of right heart measurements in top-level athletes: the training impact. *Int. J. Cardiol.* **164**, 48–57 (2013).
253. D'Andrea, A. *et al.* Association between left ventricular structure and cardiac performance during effort in two morphological forms of athlete's heart. *Int. J. Cardiol.* **86**, 177–184 (2002).
254. Baggish, A. L. *et al.* Training-specific changes in cardiac structure and function: a prospective and longitudinal assessment of competitive athletes. *J. Appl. Physiol.* **104**, 1121–1128 (2008).
255. Montgomery, H. E. *et al.* Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation* **96**, 741–747 (1997).
256. Baggish, A. L. *et al.* Impact of family hypertension history on exercise-induced cardiac remodeling. *Am. J. Cardiol.* **104**, 101–106 (2009).
257. Bostrom, P. *et al.* C/EBPbeta controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell* **143**, 1072–1083 (2010).
258. DeBosch, B. *et al.* Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* **113**, 2097–2104 (2006).
259. Guasch, E. & Nattel, S. CrossTalk proposal: Prolonged intense exercise training does lead to

- myocardial damage. *J. Physiol.* **591**, 4939–41 (2013).
260. index @ www.runningusa.org. at <http://www.runningusa.org/index.cfm?fuseaction=runningusawire.details&ArticleId=1461&returnTo=march-1>
261. Eijsvogels, T. M. H., Fernandez, A. B. & Thompson, P. D. Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise? *Physiol. Rev.* **96**, 99–125 (2016).
262. Breuckmann, F. *et al.* Myocardial late gadolinium enhancement: prevalence, pattern, and prognostic relevance in marathon runners. *Radiology* **251**, 50–57 (2009).
263. Mohlenkamp, S. *et al.* Running: the risk of coronary events : Prevalence and prognostic relevance of coronary atherosclerosis in marathon runners. *Eur. Heart J.* **29**, 1903–1910 (2008).
264. Vlachopoulos, C. *et al.* Arterial stiffness and wave reflections in marathon runners. *Am. J. Hypertens.* **23**, 974–979 (2010).
265. Kim, J. H. & Baggish, A. L. Physical Activity, Endurance Exercise, and Excess???Can One Overdose? *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **18**, (2016).
266. Mons, U., Hahmann, H. & Brenner, H. A reverse J-shaped association of leisure time physical activity with prognosis in patients with stable coronary heart disease: evidence from a large cohort with repeated measurements. *Heart heartjnl--2013--305242* (2014). doi:10.1136/heartjnl-2013-305242
267. O’Keefe, J. H., Lavie, C. J. & Guazzi, M. Part 1: potential dangers of extreme endurance exercise: how much is too much? Part 2: screening of school-age athletes. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **57**, 396–405 (2015).
268. Schnohr, P., O’Keefe, J. H., Marott, J. L., Lange, P. & Jensen, G. B. Dose of jogging and long-term mortality: the Copenhagen City Heart Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 411–419 (2015).
269. Armstrong, M. E. G., Green, J., Reeves, G. K., Beral, V. & Cairns, B. J. Frequent physical activity may not reduce vascular disease risk as much as moderate activity: large prospective study of women in the United Kingdom. *Circulation* **131**, 721–9 (2015).
270. Elosua, R. *et al.* Sport practice and the risk of lone atrial fibrillation: A case-control study. *Int. J. Cardiol.* **108**, 332–337 (2006).
271. Heidbuchel, H. *et al.* Endurance sports is a risk factor for atrial fibrillation after ablation for atrial flutter. *Int. J. Cardiol.* **107**, 67–72 (2006).
272. Abdulla, J. & Nielsen, J. R. Is the risk of atrial fibrillation higher in athletes than in the general population? A systematic review and meta-analysis. *Eur. Eur. pacing, arrhythmias, Card. Electrophysiol. J. Work. groups Card. pacing, arrhythmias, Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* **11**, 1156–1159 (2009).
273. Andersen, K. *et al.* Risk of arrhythmias in 52 755 long-distance cross-country skiers: a cohort study. *Eur. Heart J.* (2013). doi:10.1093/eurheartj/eh188
274. Aizer, A. *et al.* Relation of Vigorous Exercise to Risk of Atrial Fibrillation. *Am. J. Cardiol.* **103**, 1572–1577 (2009).
275. Wilhelm, M. *et al.* Atrial remodeling, autonomic tone, and lifetime training hours in nonelite athletes. *Am. J. Cardiol.* **108**, 580–585 (2011).
276. Guasch, E. *et al.* Atrial fibrillation promotion by endurance exercise: demonstration and mechanistic exploration in an animal model. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 68–77 (2013).
277. Aschar-Sobbi, R. *et al.* Increased atrial arrhythmia susceptibility induced by intense endurance exercise in mice requires TNF $\alpha$ . *Nat. Commun.* **6**, 6018 (2015).
278. James, C. A. *et al.* Exercise increases age-related penetrance and arrhythmic risk in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated desmosomal mutation carriers. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 1290–1297 (2013).
279. Benito, B. *et al.* Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation* **123**, 13–22 (2011).
280. Ector, J. *et al.* Reduced right ventricular ejection fraction in endurance athletes presenting with ventricular arrhythmias: a quantitative angiographic assessment. *Eur. Heart J.* **28**, 345–353 (2007).
281. Gaziano, T. A., Bitton, A., Anand, S., Abrahams-Gessel, S. & Murphy, A. Growing epidemic of coronary heart disease in low- and middle-income countries. *Curr. Probl. Cardiol.* **35**, 72–115 (2010).
282. Weber, C. & Noels, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* **17**, 1410–1422 (2011).
283. Aikawa, E. *et al.* Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* **116**, 2841–2850 (2007).
284. Möhlenkamp, S. *et al.* Running: the risk of coronary events : Prevalence and prognostic relevance of coronary atherosclerosis in marathon runners. *Eur. Heart J.* **29**, 1903–10 (2008).
285. Schwartz, R. S. *et al.* Increased Coronary Artery Plaque Volume Among Male Marathon Runners. *Mo. Med.* **111**, 87–92 (2014).
286. Criqui, M. H. *et al.* Calcium density of coronary artery plaque and risk of incident cardiovascular events. *JAMA* **311**, 271–278 (2014).
287. Hemecourt, P. *et al.* Cardiac arrest during long-distance running races. (2012).
288. Popovic, R. M. & White, D. P. Upper airway muscle activity in normal women: influence of hormonal status. *J. Appl. Physiol.* **84**, 1055–1062 (1998).
289. Schwab, J. Sex differences and sleep apnoea. *Thorax* **54**, 284–285 (1999).
290. Löwenberg B, Downing J, B. A. Clinical presentation. *N Engl J Med* **341**, 1051–1062 (1999).
291. Lloberes, P. *et al.* Diagnosis and treatment of sleep apnea-hypopnea syndrome. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. *Arch. Bronconeumol.* **47**, 143–156 (2011).
292. Berry, R. B. *et al.* Rules for scoring respiratory



- events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J. Clin. sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* **8**, 597–619 (2012).
293. Parati, G. *et al.* Position paper on the management of patients with obstructive sleep apnea and hypertension: joint recommendations by the European Society of Hypertension, by the European Respiratory Society and by the members of European COST (COoperation in Scientific a. J. *Hypertens.* **30**, 633–646 (2012).
294. Ali, N. J., Davies, R. J., Fleetham, J. A. & Stradling, J. R. The acute effects of continuous positive airway pressure and oxygen administration on blood pressure during obstructive sleep apnea. *Chest* **101**, 1526–1532 (1992).
295. Casey, K. R. Heart failure, central sleep apnea, CPAP, and arousals: another piece of the puzzle. *Sleep* **32**, 13–14 (2009).
296. No Title. at <[https://www.nhlbi.nih.gov/health-spanish/health-topics/temas/sleep\\_apnea](https://www.nhlbi.nih.gov/health-spanish/health-topics/temas/sleep_apnea)>
297. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep* **22**, 667–689 (1999).
298. Sullivan, C. E., Issa, F. G., Berthon-Jones, M. & Eves, L. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet (London, England)* **1**, 862–865 (1981).
299. Sila, C. A. Medical management. **358**, 1617–1618 (2008).
300. Trinder, J. *et al.* Autonomic activity during human sleep as a function of time and sleep stage. *J. Sleep Res.* **10**, 253–264 (2001).
301. Fletcher, E. C. Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. *Respir. Physiol.* **119**, 189–197 (2000).
302. Bradley, T. D., Hall, M. J., Ando, S. & Floras, J. S. Hemodynamic effects of simulated obstructive apneas in humans with and without heart failure. *Chest* **119**, 1827–1835 (2001).
303. Brinker, J. A. *et al.* Leftward septal displacement during right ventricular loading in man. *Circulation* **61**, 626–633 (1980).
304. Tolle, F. A., Judy, W. V., Yu, P. L. & Markand, O. N. Reduced stroke volume related to pleural pressure in obstructive sleep apnea. *J. Appl. Physiol.* **55**, 1718–1724 (1983).
305. Cargill, R. I., Kiely, D. G. & Lipworth, B. J. Adverse effects of hypoxaemia on diastolic filling in humans. *Clin. Sci. (Lond)*. **89**, 165–169 (1995).
306. Somers, V. K., Mark, A. L., Zavala, D. C. & Abboud, F. M. Contrasting effects of hypoxia and hypercapnia on ventilation and sympathetic activity in humans. *J. Appl. Physiol.* **67**, 2101–2106 (1989).
307. Horner, R. L., Brooks, D., Kozar, L. F., Tse, S. & Phillipson, E. A. Immediate effects of arousal from sleep on cardiac autonomic outflow in the absence of breathing in dogs. *J. Appl. Physiol.* **79**, 151–162 (1995).
308. Blasi, A. *et al.* Cardiovascular variability after arousal from sleep: time-varying spectral analysis. *J. Appl. Physiol.* **95**, 1394–1404 (2003).
309. Kendzerska, T., Gershon, A. S., Hawker, G., Leung, R. S. & Tomlinson, G. Obstructive sleep apnea and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: a decade-long historical cohort study. *PLoS Med.* **11**, e1001599 (2014).
310. Gottlieb, D. J. *et al.* Relation of sleepiness to respiratory disturbance index: the Sleep Heart Health Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 502–507 (1999).
311. Mazza, S. *et al.* Most obstructive sleep apnoea patients exhibit vigilance and attention deficits on an extended battery of tests. *Eur. Respir. J.* **25**, 75–80 (2005).
312. Young, T. *et al.* Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep* **31**, 1071–1078 (2008).
313. Mooe, T., Franklin, K. A., Holmstrom, K., Rabben, T. & Wiklund, U. Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1910–1913 (2001).
314. Parati, G. *et al.* Heart failure and sleep disorders. *Nat. Rev. Cardiol.* (2016). doi:10.1038/nrcardio.2016.71
315. Young, T. *et al.* Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch. Intern. Med.* **157**, 1746–1752 (1997).
316. Garcia-Rio, F. *et al.* CPAP effect on recurrent episodes in patients with sleep apnea and myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **168**, 1328–1335 (2013).
317. Gami, A. S., Howard, D. E., Olson, E. J. & Somers, V. K. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1206–1214 (2005).
318. Shahar, E. *et al.* Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 19–25 (2001).
319. Marin, J. M., Carrizo, S. J., Vicente, E. & Agusti, A. G. N. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet (London, England)* **365**, 1046–1053 (2005).
320. Gaisl, T., Bratton, D. J. & Kohler, M. The impact of obstructive sleep apnoea on the aorta. *Eur. Respir. J.* ERJ-00293-2015 (2015). doi:10.1183/09031936.00029315
321. Tachikawa, R. *et al.* Obstructive sleep apnea and abdominal aortic calcification: Is there an association independent of comorbid risk factors? *Atherosclerosis* **241**, 6–11 (2015).
322. Kohler, M. & Stradling, J. R. Mechanisms of vascular damage in obstructive sleep apnea. *Nat.*

- Rev. Cardiol.* **7**, 677–685 (2010).
323. Prinz, C. *et al.* Sleep apnea is common in patients with coronary artery disease. *Wien. Med. Wochenschr.* **160**, 349–355 (2010).
324. Yun, C.-H. *et al.* Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J. Clin. Neurol.* **6**, 89–98 (2010).
325. Drager, L. F. *et al.* The incremental role of obstructive sleep apnoea on markers of atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* **208**, 490–495 (2010).
326. Turmel, J. *et al.* Relationship between atherosclerosis and the sleep apnea syndrome: an intravascular ultrasound study. *Int. J. Cardiol.* **132**, 203–209 (2009).
327. Sorajja, D. *et al.* Independent association between obstructive sleep apnea and subclinical coronary artery disease. *Chest* **133**, 927–933 (2008).
328. Drager, L. F. *et al.* Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 613–618 (2005).
329. Drager, L. F., Bortolotto, L. A., Krieger, E. M. & Lorenzi-Filho, G. Additive effects of obstructive sleep apnea and hypertension on early markers of carotid atherosclerosis. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **53**, 64–69 (2009).
330. Redline, S. *et al.* Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 269–277 (2010).
331. Lee, L.-C. *et al.* The relative impact of obstructive sleep apnea and hypertension on the structural and functional changes of the thoracic aorta. *Sleep* **33**, 1173–1176 (2010).
332. Stiefel, P. *et al.* Obstructive sleep apnea syndrome, vascular pathology, endothelial function and endothelial cells and circulating microparticles. *Arch Med Res* **44**, 409–414 (2013).
333. Hoyos, C. M., Melehan, K. L., Liu, P. Y., Grunstein, R. R. & Phillips, C. L. Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature. *Sleep Med. Rev.* **20**, 15–26 (2014).
334. Friedman, J. K. *et al.* Intermittent hypoxia-induced increases in reactive oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity. *Vascul. Pharmacol.* **60**, 17–24 (2014).
335. Matiello, M. *et al.* Low efficacy of atrial fibrillation ablation in severe obstructive sleep apnoea patients. *Eur. Eur. pacing, arrhythmias, Card. Electrophysiol. J. Work. groups Card. pacing, arrhythmias, Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* **12**, 1084–1089 (2010).
336. Ng, C. Y. *et al.* Meta-analysis of obstructive sleep apnea as predictor of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation. *Am. J. Cardiol.* **108**, 47–51 (2011).
337. Mahnkopf, C. *et al.* Evaluation of the left atrial substrate in patients with lone atrial fibrillation using delayed-enhanced MRI: implications for disease progression and response to catheter ablation. *Heart Rhythm* **7**, 1475–1481 (2010).
338. Linz, D., Schotten, U., Neuberger, H.-R., Bohm, M. & Wirth, K. Negative tracheal pressure during obstructive respiratory events promotes atrial fibrillation by vagal activation. *Heart Rhythm* **8**, 1436–1443 (2011).
339. Linz, D. *et al.* Effect of renal denervation on neurohumoral activation triggering atrial fibrillation in obstructive sleep apnea. *Hypertension* **62**, 767–774 (2013).
340. Ghias, M. *et al.* The role of ganglionated plexi in apnea-related atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 2075–2083 (2009).
341. Nacher, M. *et al.* Recurrent obstructive apneas trigger early systemic inflammation in a rat model of sleep apnea. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **155**, 93–6 (2007).
342. Minguell, J. J., Erices, A. & Conget, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **226**, 507–520 (2001).
343. Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A. & Simmons, P. J. Mesenchymal stem cells. *Arch. Med. Res.* **34**, 565–571 (2003).
344. Herrmann, R. *et al.* Mesenchymal stromal cell therapy for steroid-refractory acute and chronic graft versus host disease: a phase 1 study. *Int. J. Hematol.* **95**, 182–188 (2012).
345. Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41–49 (2002).
346. Hatzistergos, K. E. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ. Res.* **107**, 913–922 (2010).
347. Bian, S. *et al.* Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J. Mol. Med. (Berl)*. **92**, 387–397 (2014).
348. Van Linthout, S., Stamm, C., Schultheiss, H.-P. & Tschöpe, C. Mesenchymal stem cells and inflammatory cardiomyopathy: cardiac homing and beyond. *Cardiol. Res. Pract.* **2011**, 757154 (2011).
349. Angoulvant, D. *et al.* Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *J. Heart Lung Transplant.* **30**, 95–102 (2011).
350. Timmers, L. *et al.* Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.* **6**, 206–214 (2011).
351. Timmers, L. *et al.* Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res.* **1**, 129–137 (2007).
352. Heldman, A. W. *et al.* Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA* **311**, 62–73 (2014).
353. Mazo, M., Araña, M., Pelacho, B. & Prosper, F. Mesenchymal stem cells and cardiovascular disease: A bench to bedside roadmap. *Stem Cells Int.* **2012**, (2012).
354. Carreras, A. *et al.* Obstructive apneas induce early

- release of mesenchymal stem cells into circulating blood. *Sleep* **32**, 117–119 (2009).
355. Kheirandish-Gozal, L., Bhattacharjee, R., Kim, J., Clair, H. B. & Gozal, D. Endothelial progenitor cells and vascular dysfunction in children with obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 92–97 (2010).
  356. Nagaya, N. *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* **112**, 1128–1135 (2005).
  357. Li, L. *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure. *Transpl. Int.* **21**, 1181–1189 (2008).
  358. Morton, D. B. & Griffiths, P. H. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* **116**, 431–436 (1985).
  359. Guasch, E. *et al.* Atrial fibrillation promotion by endurance exercise: Demonstration and mechanistic exploration in an animal model. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 68–77 (2013).
  360. Gavish, B. & Izzo, J. L. Arterial Stiffness: Going a Step Beyond. *Am. J. Hypertens.* 1–11 (2016). doi:10.1093/ajh/hpw061
  361. Kuo, M. M. *et al.* Measuring ascending aortic stiffness in vivo in mice using ultrasound. *J. Vis. Exp.* 1–8 (2014). doi:10.3791/52200
  362. Schmitz, N., Laverty, S., Kraus, V. B. & Aigner, T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage* **18 Suppl 3**, S113-6 (2010).
  363. Manders, E. M. M., Verbeek, F. J. & Ate, J. a. Measurement of co-localisation of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy* **169**, 375–382 (1993).
  364. Romero-Calvo, I. *et al.* Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* **401**, 318–320 (2010).
  365. Ringner, M. What is principal component analysis? *Nat. Biotechnol.* **26**, 303–304 (2008).
  366. Paraskevopoulou, M. D. *et al.* DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res.* **41**, W169-73 (2013).
  367. Cline, M. S. *et al.* Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat. Protoc.* **2**, 2366–2382 (2007).
  368. Vlachos, I. S. *et al.* DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **43**, W460-6 (2015).
  369. Vlachos, I. S. *et al.* DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **43**, D153-9 (2015).
  370. Mulvany, M. J. & Halpern, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.* **41**, 19–26 (1977).
  371. Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A. & Herzyk, P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett.* **573**, 83–92 (2004).
  372. Farre, R. *et al.* Rat model of chronic recurrent airway obstructions to study the sleep apnea syndrome. *Sleep* **30**, 930–933 (2007).
  373. Montes, G. S. & Junqueira, L. C. The use of the Picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **86 Suppl 3**, 1–11 (1991).
  374. Høydal, M. a, Wisløff, U., Kemi, O. J. & Ellingsen, O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **14**, 753–60 (2007).
  375. Wang, Y., Wisloff, U. & Kemi, O. J. Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. *Physiol. Res.* **59**, 633–44 (2010).
  376. Sugawara, J., Murakami, H., Maeda, S., Kuno, S. & Matsuda, M. Change in post-exercise vagal reactivation with exercise training and detraining in young men. *Eur. J. Appl. Physiol.* **85**, 259–263 (2001).
  377. Smith, M. L., Hudson, D. L., Graitzer, H. M. & Raven, P. B. Exercise training bradycardia: the role of autonomic balance. *Med. Sci. Sports Exerc.* **21**, 40–44 (1989).
  378. Gupt, A. M., Kumar, M., Sharma, R. K., Misra, R. & Gupt, A. Effect of Moderate Aerobic Exercise Training on Autonomic Functions and its Correlation with the Antioxidant Status. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **59**, 162–169 (2015).
  379. Professional Associations for Physical Activity. *Physical Activity in the Prevention and Treatment of Disease. Medicine & Science in Sports & Exercise* (2010).
  380. Lin, Y. C. & Horvath, S. M. Autonomic nervous control of cardiac frequency in the exercise-trained rat. *J. Appl. Physiol.* **33**, 796–799 (1972).
  381. Kaplan, M. L. *et al.* Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am. J. Physiol.* **267**, H1167-73 (1994).
  382. Guasch, E. & Mont, L. Diagnosis, pathophysiology, and management of exercise-induced arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol.* (2016). doi:doi:10.1038/nrcardio.2016.173
  383. Danson, E. J. F. & Paterson, D. J. Enhanced neuronal nitric oxide synthase expression is central to cardiac vagal phenotype in exercise-trained mice. *J. Physiol.* **546**, 225–232 (2003).
  384. Stein, R., Medeiros, C. M., Rosito, G. A., Zimmerman, L. I. & Ribeiro, J. P. Intrinsic sinus and atrioventricular node electrophysiologic adaptations in endurance athletes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1033–1038 (2002).
  385. D'Souza, A. *et al.* Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4. *Nat. Commun.* **5**, 3775 (2014).
  386. Cornelissen, V. A. & Fagard, R. H. Effect of resistance training on resting blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Hypertens.* **23**, 251–259 (2005).
  387. Medeiros, A. *et al.* Swimming training increases

- cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**, 1909–1917 (2004).
388. Seals, D. R., Desouza, C. A., Donato, A. J. & Tanaka, H. Habitual exercise and arterial aging. *J. Appl. Physiol.* **105**, 1323–1332 (2008).
389. Kinoshita, N. *et al.* Aortic root dilatation among young competitive athletes: echocardiographic screening of 1929 athletes between 15 and 34 years of age. *Am. Heart J.* **139**, 723–728 (2000).
390. Iskandar, A. & Thompson, P. D. A meta-analysis of aortic root size in elite athletes. *Circulation* **127**, 791–8 (2013).
391. Boraita, A. *et al.* Reference Values of Aortic Root in Male and Female White Elite Athletes According to Sport. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **9**, (2016).
392. Chironi, G. *et al.* Early thoracic aorta enlargement in asymptomatic individuals. Chironi G, Orobinskaia L, Megnien J-L, Sirieix M-E, Clement-Guinaudeau S, Bensalah M, *et al.* Early thoracic aorta enlargement in asymptomatic individuals at risk for cardiovascular disease: dete. *J. Hypertens.* **28**, 2134–2138 (2010).
393. Craiem, D. *et al.* Three-dimensional evaluation of thoracic aorta enlargement and unfolding in hypertensive men using non-contrast computed tomography. *J. Hum. Hypertens.* **27**, 504–509 (2013).
394. Mohiaddin, R. H. *et al.* Regional aortic compliance studied by magnetic resonance imaging: the effects of age, training, and coronary artery disease. *Br. Heart J.* **62**, 90–96 (1989).
395. Moulakakis, K. G. *et al.* The effects of hypothyroidism on the mechanical properties and histomorphological structure of the thoracic aorta. *Angiology* **61**, 259–268 (2010).
396. Yurtdas, M., Ozcan, T., Gen, R. & Aydin, M. K. Assessment of the elasticity properties of the ascending aorta in patients with subclinical hypothyroidism by tissue Doppler imaging. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* **57**, 395–396 (2013).
397. Greenwald, S. E. Ageing of the conduit arteries. *J. Pathol.* **211**, 157–172 (2007).
398. Duca, L. *et al.* Matrix aging and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovasc. Res.* **8**, 298–308 (2016).
399. Benetos, A., Rudnichi, A., Safar, M. & Guize, L. Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertension* **32**, 560–564 (1998).
400. Roman, M. J. *et al.* Central pressure more strongly relates to vascular disease and outcome than does brachial pressure: the Strong Heart Study. *Hypertension* **50**, 197–203 (2007).
401. Tanaka, H. *et al.* Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation* **102**, 1270–1275 (2000).
402. Currie, K. D., Thomas, S. G. & Goodman, J. M. Effects of short-term endurance exercise training on vascular function in young males. *Eur. J. Appl. Physiol.* **107**, 211–218 (2009).
403. Knez, W. L., Sharman, J. E., Jenkins, D. G. & Coombes, J. S. Central hemodynamics in ultra-endurance athletes. *J. Sci. Med. Sport* **11**, 390–395 (2008).
404. Vaitkevicius, P. V. *et al.* Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation* **88**, 1456–1462 (1993).
405. Ashor, A. W., Lara, J., Siervo, M., Celis-Morales, C. & Mathers, J. C. Effects of exercise modalities on arterial stiffness and wave reflection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* **9**, e110034 (2014).
406. Kasikcioglu, E., Kayserilioglu, a, Oflaz, H. & Akhan, H. Aortic distensibility and left ventricular diastolic functions in endurance athletes. *Int. J. Sports Med.* **26**, 165–70 (2005).
407. Erol, M. K., Yilmaz, M., Oztasyonar, Y., Sevimli, S. & Senocak, H. Aortic distensibility is increasing in elite athletes. *Am. J. Cardiol.* **89**, 1002–1004 (2002).
408. Cioni, G., Berni, A., Gensini, G. F., Abbate, R. & Boddi, M. Impaired Femoral Vascular Compliance and Endothelial Dysfunction in 30 Healthy Male Soccer Players: Competitive Sports and Local Detrimental Effects. *Sports Health* **7**, 335–340 (2015).
409. Vlachopoulos, C. *et al.* Arterial stiffness and wave reflections in marathon runners. *Am. J. Hypertens.* **23**, 974–9 (2010).
410. Burr, J. F. *et al.* Long-term ultra-marathon running and arterial compliance. *J. Sci. Med. Sport* **17**, 322–325 (2014).
411. Tanaka, L. Y. *et al.* Exercise improves endothelial function: A local analysis of production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Nitric Oxide* **45**, 7–14 (2015).
412. Delp, M. D. & Laughlin, M. H. Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* **29**, 1454–1461 (1997).
413. Delp, M. D., McAllister, R. M. & Laughlin, M. H. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J. Appl. Physiol.* **75**, 1354–1363 (1993).
414. Chen, H. I. & Li, H. T. Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. *Arterioscler. Thromb. a J. Vasc. Biol. / Am. Hear. Assoc.* **13**, 852–856 (1993).
415. Goto, C. *et al.* Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation* **108**, 530–535 (2003).
416. Goto, C. Effect of Different Intensities of Exercise on Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans: Role of Endothelium-Dependent Nitric Oxide and Oxidative Stress. *Circulation* **108**, 530–535 (2003).
417. Miller, V. M. & Vanhoutte, P. M. Enhanced release of endothelium-derived factor(s) by chronic increases in blood flow. *Am. J. Physiol.* **255**, H446–51 (1988).

418. Kawai, Y., Yokoyama, Y., Kaidoh, M. & Ohhashi, T. Shear stress-induced ATP-mediated endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human lymphatic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C647-55 (2010).
419. Sessa, W. C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J. & Hintze, T. H. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ. Res.* **74**, 349–353 (1994).
420. Thijssen, D. H. J. *et al.* Impact of inactivity and exercise on the vasculature in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* **108**, 845–75 (2010).
421. Tinken, T. M., Thijssen, D. H., Black, M. a, Cable, N. T. & Green, D. J. Time course of change in vasodilator function and capacity in response to exercise training in humans. *J Physiol* **586**, 5003–5012 (2008).
422. Green, D. J., Maiorana, A., O’Driscoll, G. & Taylor, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J. Physiol.* **561**, 1–25 (2004).
423. Davis, M. E., Cai, H., McCann, L., Fukai, T. & Harrison, D. G. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H1449-53 (2003).
424. Indolfi, C. *et al.* Physical training increases eNOS vascular expression and activity and reduces restenosis after balloon angioplasty or arterial stenting in rats. *Circ. Res.* **91**, 1190–1197 (2002).
425. Hambrecht, R. *et al.* Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **107**, 3152–3158 (2003).
426. Farah, C. *et al.* Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res. Cardiol.* **108**, 389 (2013).
427. Grijalva, J. *et al.* Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Cardiovasc. Diabetol.* **7**, 34 (2008).
428. Harrison, D. G. *et al.* Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J. Intern. Med.* **259**, 351–363 (2006).
429. Corson, M. A. *et al.* Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ. Res.* **79**, 984–991 (1996).
430. Gurdal, H., Can, A. & Ugur, M. The role of nitric oxide synthase in reduced vasocontractile responsiveness induced by prolonged alpha1-adrenergic receptor stimulation in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.* **145**, 203–210 (2005).
431. Bechara, L. & Tanaka, L. bout of moderate-intensity exercise increases vascular NO bioavailability and attenuates adrenergic receptor-dependent and-independent vasoconstrictor response. *J. Smooth ...* **44**, 101–111 (2008).
432. Jansakul, C. Effect of swimming on vascular reactivity to phenylephrine and KC1 in male rats. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 587–594 (1995).
433. Oltman, C. L., Parker, J. L., Adams, H. R. & Laughlin, M. H. Effects of exercise training on vasomotor reactivity of porcine coronary arteries. *Am. J. Physiol.* **263**, H372-82 (1992).
434. Edwards, J. G., Tipton, C. M. & Matthes, R. D. Influence of exercise training on reactivity and contractility of arterial strips from hypertensive rats. *J. Appl. Physiol.* **58**, 1683–1688 (1985).
435. Howard, M. G., DiCarlo, S. E. & Stallone, J. N. Acute exercise attenuates phenylephrine-induced contraction of rabbit isolated aortic rings. *Med. Sci. Sports Exerc.* **24**, 1102–1107 (1992).
436. Luiz, T. *et al.* Original Article Effects of One Resistance Exercise Session on Vascular Smooth Muscle of Hypertensive Rats. 160–167 (2015). doi:10.5935/abc.20150070
437. Bowles, D. K., Hu, Q., Laughlin, M. H. & Sturek, M. Exercise Training Increases L-Type Calcium Current Density in Coronary Smooth Muscle. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **30**, 39 (1998).
438. Chen, Y. *et al.* Exercise intensity-dependent reverse and adverse remodeling of voltage-gated Ca(2+) channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 1–10 (2015). doi:10.1038/hr.2015.56
439. Mitchell, G. F. *et al.* Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension* **43**, 1239–1245 (2004).
440. Mahmud, A. & Feely, J. Effect of smoking on arterial stiffness and pulse pressure amplification. *Hypertension* **41**, 183–187 (2003).
441. Lehmann, E. D., Gosling, R. G. & Sonksen, P. H. Arterial wall compliance in diabetes. *Diabet. Med.* **9**, 114–119 (1992).
442. Wang, Y.-X. *et al.* Reduction of cardiac functional reserve and elevation of aortic stiffness in hyperlipidemic Yucatan minipigs with systemic and coronary atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* **39**, 69–76 (2002).
443. Mitchell, G. F. *et al.* Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation* **121**, 505–511 (2010).
444. Mattace-Raso, F. U. S. *et al.* Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* **113**, 657–663 (2006).
445. O’Rourke, M. F., Safar, M. E. & Dzau, V. The Cardiovascular Continuum extended: aging effects on the aorta and microvasculature. *Vasc. Med.* **15**, 461–468 (2010).
446. Michaelides, A. P. *et al.* Exercise duration as a determinant of vascular function and antioxidant balance in patients with coronary artery disease. *Heart* **97**, 832–837 (2011).
447. Dickhout, J. G. *et al.* Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: implications in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2623–2629 (2005).
448. Morishita, R. *et al.* Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J.*

- Clin. Invest.* **94**, 978–984 (1994).
449. Eto, H. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor participates in extracellular matrix production in the late stage of remodeling after vascular injury. *Cardiovasc. Res.* **59**, 200–211 (2003).
  450. Akishita, M. *et al.* Angiotensin converting enzyme inhibitor restrains inflammation-induced vascular injury in mice. *J. Hypertens.* **19**, 1083–1088 (2001).
  451. An, S. J. *et al.* NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* **75**, 702–9 (2007).
  452. Cai, H., Griendling, K. K. & Harrison, D. G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 471–478 (2003).
  453. Rajagopalan, S. *et al.* Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* **97**, 1916–1923 (1996).
  454. van Rooij, E. & Olson, E. N. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 860–72 (2012).
  455. Thum, T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO Mol. Med.* **4**, 3–14 (2012).
  456. Fraigneau, S., Palii, C. G., Allan, D. S. & Brand, M. Epigenetic regulation of endothelial-cell-mediated vascular repair. *FEBS J.* **282**, 1605–1629 (2015).
  457. Shiva Shankar, T. V & Willems, L. Epigenetic modulators mitigate angiogenesis through a complex transcriptomic network. *Vascul. Pharmacol.* **60**, 57–66 (2014).
  458. Wu, X.-D. *et al.* Effect of aerobic exercise on miRNA-TLR4 signaling in atherosclerosis. *Int. J. Sports Med.* **35**, 344–350 (2014).
  459. Ucar, A. *et al.* The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat. Commun.* **3**, 1078 (2012).
  460. Eskildsen, T. V *et al.* Angiotensin II regulates microRNA-132/-212 in hypertensive rats and humans. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 11190–11207 (2013).
  461. Jin, W. *et al.* Small RNA sequencing reveals MicroRNAs that modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 15672–15683 (2012).
  462. Kumarswamy, R. *et al.* Vascular importance of the miR-212/132 cluster. *Eur. Heart J.* **35**, 3224–3231 (2014).
  463. Anand, S. *et al.* MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat. Med.* **16**, 909–914 (2010).
  464. Sun, S. *et al.* miR-146a and Krüppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation. *EMBO Rep* **12**, 56–62 (2011).
  465. Raitoharju, E. *et al.* miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* **219**, 211–217 (2011).
  466. Maegdefessel, L. *et al.* Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. *J. Clin. Invest.* **122**, 497–506 (2012).
  467. Lee, J. *et al.* MicroRNA-29b inhibits migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in neointimal formation. *J. Cell. Biochem.* **116**, 598–608 (2015).
  468. Bretschneider, M. *et al.* Activated mineralocorticoid receptor regulates micro-RNA-29b in vascular smooth muscle cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **30**, 1610–1622 (2016).
  469. Boutouyrie, P. *et al.* Opposing effects of ageing on distal and proximal large arteries in hypertensives. *J. Hypertens. Suppl.* **10**, S87-91 (1992).
  470. Benetos, A., Laurent, S., Hoeks, A. P., Boutouyrie, P. H. & Safar, M. E. Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries. *Arterioscler. Thromb. a J. Vasc. Biol.* **13**, 90–97 (1993).
  471. O’Leary, D. H. *et al.* Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N. Engl. J. Med.* **340**, 14–22 (1999).
  472. Nordstrom, C. K., Dwyer, K. M., Merz, C. N. B., Shircore, A. & Dwyer, J. H. Leisure time physical activity and early atherosclerosis: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *Am. J. Med.* **115**, 19–25 (2003).
  473. Folsom, A. R. *et al.* Relation of carotid artery wall thickness to diabetes mellitus, fasting glucose and insulin, body size, and physical activity. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Stroke* **25**, 66–73 (1994).
  474. Markus, R. A., Mack, W. J., Azen, S. P. & Hodis, H. N. Influence of lifestyle modification on atherosclerotic progression determined by ultrasonographic change in the common carotid intima-media thickness. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 1000–1004 (1997).
  475. Okada, K. *et al.* The influence of lifestyle modification on carotid artery intima-media thickness in a suburban Japanese population. *Atherosclerosis* **173**, 329–337 (2004).
  476. Tanaka, H. *et al.* Regular aerobic exercise and the age-related increase in carotid artery intima-media thickness in healthy men. *J. Appl. Physiol.* **92**, 1458–1464 (2002).
  477. Rauramaa, R. *et al.* Effects of aerobic physical exercise on inflammation and atherosclerosis in men: the DNASCO Study: a six-year randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **140**, 1007–1014 (2004).
  478. Kröger, K. *et al.* Carotid and peripheral atherosclerosis in male marathon runners. *Med. Sci. Sports Exerc.* **43**, 1142–7 (2011).
  479. Taylor, B. a *et al.* Influence of chronic exercise on carotid atherosclerosis in marathon runners. *BMJ Open* **4**, 1–6 (2014).

480. O'Rourke, M. F. & Kelly, R. P. Wave reflection in the systemic circulation and its implications in ventricular function. *Journal of hypertension* **11**, 327–337 (1993).
481. London, G. M. & Guerin, A. P. Influence of arterial pulse and reflected waves on blood pressure and cardiac function. *Am. Heart J.* **138**, 220–224 (1999).
482. MOSHER, P., ROSS, J. J., MCFATE, P. A. & SHAW, R. F. CONTROL OF CORONARY BLOOD FLOW BY AN AUTOREGULATORY MECHANISM. *Circ. Res.* **14**, 250–259 (1964).
483. Bache, R. J. & Cobb, F. R. Effect of maximal coronary vasodilation on transmural myocardial perfusion during tachycardia in the awake dog. *Circ. Res.* **41**, 648–653 (1977).
484. Hoffman, J. I. & Buckberg, G. D. The myocardial supply:demand ratio--a critical review. *Am. J. Cardiol.* **41**, 327–332 (1978).
485. Merkus, D. *et al.* Prolonged diastolic time fraction protects myocardial perfusion when coronary blood flow is reduced. *Circulation* **100**, 75–81 (1999).
486. Watanabe, H., Ohtsuka, S., Kakihana, M. & Sugishita, Y. Coronary circulation in dogs with an experimental decrease in aortic compliance. *J. Am. Coll. Cardiol.* **21**, 1497–1506 (1993).
487. Stefanadis, C., Wooley, C. F., Bush, C. A., Kolibash, A. J. & Boudoulas, H. Aortic distensibility abnormalities in coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **59**, 1300–1304 (1987).
488. Imura, T., Yamamoto, K., Satoh, T., Mikami, T. & Yasuda, H. Arteriosclerotic change in the human abdominal aorta in vivo in relation to coronary heart disease and risk factors. *Atherosclerosis* **73**, 149–155 (1988).
489. Hirai, T., Sasayama, S., Kawasaki, T. & Yagi, S. Stiffness of systemic arteries in patients with myocardial infarction. A noninvasive method to predict severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* **80**, 78–86 (1989).
490. Dai, Z., Aoki, T., Fukumoto, Y. & Shimokawa, H. Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure. *J. Cardiol.* **60**, 416–421 (2012).
491. Heagerty, A. M., Aalkjaer, C., Bund, S. J., Korsgaard, N. & Mulvany, M. J. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* **21**, 391–397 (1993).
492. Garcia, P. M. *et al.* 17beta-estradiol exerts a beneficial effect on coronary vascular remodeling in the early stages of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Menopause* **12**, 453–459 (2005).
493. van Popele, N. M. *et al.* Aortic stiffness is associated with atherosclerosis of the coronary arteries in older adults: the Rotterdam Study. *J. Hypertens.* **24**, 2371–6 (2006).
494. Delaney, J. A. C. *et al.* The association between physical activity and both incident coronary artery calcification and ankle brachial index progression: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **230**, 278–283 (2013).
495. Desai, M. Y. *et al.* Relation of degree of physical activity to coronary artery calcium score in asymptomatic individuals with multiple metabolic risk factors. *Am. J. Cardiol.* **94**, 729–732 (2004).
496. Schmermund, A., Voigtländer, T. & Nowak, B. The risk of marathon runners-live it up, run fast, die young? *Eur. Heart J.* **29**, 1800–1802 (2008).
497. Tsiflikas, I. *et al.* Prevalence of Subclinical Coronary Artery Disease in Middle-Aged, Male Marathon Runners Detected by Cardiac CT. *Rofa* **187**, 561–568 (2015).
498. Eijsvogels, T. M. H., Fernandez, A. B. & Thompson, P. D. Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise? *Physiol. Rev.* **96**, 99–125 (2016).
499. Marijon, E. *et al.* Mortality of French participants in the Tour de France (1947-2012). *Eur. Heart J.* **34**, 3145–3150 (2013).
500. Dematteis, M. *et al.* Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 227–235 (2008).
501. Tagaito, Y. *et al.* A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse. *J. Appl. Physiol.* **91**, 2758–2766 (2001).
502. Campen, M. J., Shimoda, L. A. & O'Donnell, C. P. Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice. *J. Appl. Physiol.* **99**, 2028–2035 (2005).
503. Kimoff, R. J. *et al.* Canine model of obstructive sleep apnea: model description and preliminary application. *J. Appl. Physiol.* **76**, 1810–1817 (1994).
504. Iwasaki, Y. *et al.* Atrial Fibrillation Promotion With Long-Term Repetitive Obstructive Sleep Apnea in a Rat Model. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**, 2013–2023 (2014).
505. Kimoff, R. J. *et al.* Ventilatory and arousal responses to hypoxia and hypercapnia in a canine model of obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 886–894 (1997).
506. Savransky, V. *et al.* Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 1290–1297 (2007).
507. Schlatmann, T. J. & Becker, A. E. Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta. Comparative histopathologic study of significance of medial changes. *Am. J. Cardiol.* **39**, 21–26 (1977).
508. Castro-Grattoni, a L. *et al.* Intermittent Hypoxia-Induced Cardiovascular Remodeling is Reversed by Normoxia in A Mouse Model of Sleep Apnea. *Chest* **149**, 1400–1408 (2016).
509. Arnaud, C. *et al.* The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 724–731 (2011).
510. Carreras, A. *et al.* Chronic sleep fragmentation induces endothelial dysfunction and structural vascular changes in mice. *Sleep* **37**, 1817–24 (2014).
511. Baguet, J.-P. *et al.* Increased aortic root size is associated with nocturnal hypoxia and diastolic blood pressure in obstructive sleep apnea. *Sleep*

- 34**, 1605–1607 (2011).
512. Cicek, D., Lakadamyali, H., Yagbasan, B. D., Sapmaz, I. & Muderrisoglu, H. Obstructive sleep apnoea and its association with left ventricular function and aortic root parameters in newly diagnosed, untreated patients: a prospective study. *J. Int. Med. Res.* **39**, 2228–2238 (2011).
  513. Serizawa, N. *et al.* Obstructive sleep apnea is associated with greater thoracic aortic size. *Journal of the American College of Cardiology* **52**, 885–886 (2008).
  514. Tanriverdi, H. *et al.* Aortic stiffness, flow-mediated dilatation and carotid intima-media thickness in obstructive sleep apnea: non-invasive indicators of atherosclerosis. *Respiration*. **73**, 741–750 (2006).
  515. Young, T. *et al.* Burden of sleep apnea: rationale, design, and major findings of the Wisconsin Sleep Cohort study. *WMJ* **108**, 246–249 (2009).
  516. Kario, K. Obstructive sleep apnea syndrome and hypertension: ambulatory blood pressure. *Hypertens. Res.* **32**, 428–432 (2009).
  517. Tachikawa, R. *et al.* Impact of obstructive sleep apnea on abdominal aortic diameters. *Am. J. Cardiol.* **114**, 618–623 (2014).
  518. Meuleman, C. *et al.* Is the aortic root dilated in obstructive sleep apnoea syndrome? *Arch. Cardiovasc. Dis.* **101**, 391–397 (2008).
  519. Vasan, R. S., Larson, M. G. & Levy, D. Determinants of echocardiographic aortic root size. The Framingham Heart Study. *Circulation* **91**, 734–740 (1995).
  520. Hagan, P. G. *et al.* The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease. *JAMA* **283**, 897–903 (2000).
  521. Hirata, K. *et al.* The Marfan syndrome: abnormal aortic elastic properties. *J. Am. Coll. Cardiol.* **18**, 57–63 (1991).
  522. Canadas, V., Vilacosta, I., Bruna, I. & Fuster, V. Marfan syndrome. Part 2: treatment and management of patients. *Nat. Rev. Cardiol.* **7**, 266–276 (2010).
  523. Kohler, M. *et al.* The prevalence of obstructive sleep apnoea and its association with aortic dilatation in Marfan’s syndrome. *Thorax* **64**, 162–166 (2009).
  524. Kohler, M. *et al.* The impact of obstructive sleep apnea on aortic disease in Marfan’s syndrome. *Respiration*. **86**, 39–44 (2013).
  525. Sampol, G. *et al.* Obstructive sleep apnea and thoracic aorta dissection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 1528–1531 (2003).
  526. Saruhara, H. *et al.* Obstructive sleep apnea as a potential risk factor for aortic disease. *Heart Vessels* **27**, 166–173 (2012).
  527. Naito, R. *et al.* Aortic dissection is associated with intermittent hypoxia and re-oxygenation. *Heart Vessels* **27**, 265–270 (2012).
  528. Lee, L.-C. *et al.* The relative impact of obstructive sleep apnea and hypertension on the structural and functional changes of the thoracic aorta. *Sleep* **33**, 1173–1176 (2010).
  529. Achour, E. C. *et al.* Aortic root size and sleep apnea in elderly: a cohort study. *International journal of cardiology* **151**, 101–102 (2011).
  530. Sampol, G. *et al.* Obstructive Sleep Apnea and Thoracic Aorta Dissection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 1528–1531 (2003).
  531. Clarenbach, C. F. *et al.* Effect of simulated obstructive hypopnea and apnea on thoracic aortic wall transmural pressures. *J. Appl. Physiol.* **115**, 613–617 (2013).
  532. Somers, V. K., Dyken, M. E., Clary, M. P. & Abboud, F. M. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J. Clin. Invest.* **96**, 1897–1904 (1995).
  533. Moon, J.-Y. Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension. *Electrolyte Blood Press.* **11**, 41–45 (2013).
  534. Escobar, E., Rodriguez-Reyna, T. S., Arrieta, O. & Sotelo, J. Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2**, 385–399 (2004).
  535. Pimenta, E., Calhoun, D. A. & Oparil, S. Sleep apnea, aldosterone, and resistant hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **51**, 371–380 (2009).
  536. Fletcher, E. C., Orolinova, N. & Bader, M. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system. *J. Appl. Physiol.* **92**, 627–633 (2002).
  537. Takahashi, S., Nakamura, Y., Nishijima, T., Sakurai, S. & Inoue, H. Essential roles of angiotensin II in vascular endothelial growth factor expression in sleep apnea syndrome. *Respir. Med.* **99**, 1125–1131 (2005).
  538. Kraiczai, H., Hedner, J., Peker, Y. & Carlson, J. Increased vasoconstrictor sensitivity in obstructive sleep apnea. *J. Appl. Physiol.* **89**, 493–498 (2000).
  539. Hoffmann, M., Bybee, K., Accurso, V. & Somers, V. K. Sleep apnea and hypertension. *Minerva Med.* **95**, 281–290 (2004).
  540. Yamauchi, M. *et al.* Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest* **127**, 1674–1679 (2005).
  541. Gonchar, O. & Mankovska, I. Moderate hypoxia/hyperoxia attenuates acute hypoxia-induced oxidative damage and improves antioxidant defense in lung mitochondria. *Acta Physiol. Hung.* **99**, 436–446 (2012).
  542. Lavie, L. Oxidative stress--a unifying paradigm in obstructive sleep apnea and comorbidities. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **51**, 303–312 (2009).
  543. Dyugovskaya, L., Lavie, P. & Lavie, L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 934–939 (2002).
  544. Schulz, R. *et al.* Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 566–570 (2000).
  545. Jelic, S. *et al.* Inflammation, oxidative stress, and



- repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* **117**, 2270–2278 (2008).
546. Badran, M., Ayas, N. & Laher, I. Cardiovascular complications of sleep apnea: Role of oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 10 (2014).
547. Christou, K., Moulas, A. N., Pastaka, C. & Gourgoulianis, K. I. Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Med.* **4**, 225–228 (2003).
548. Hitomi, H., Kiyomoto, H. & Nishiyama, A. Angiotensin II and oxidative stress. *Curr. Opin. Cardiol.* **22**, 311–315 (2007).
549. Dikalov, S. I. & Nazarewicz, R. R. Angiotensin II-Induced Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Potential Mechanisms and Relevance for Cardiovascular Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 120521090703005 (2012).
550. Yim-Yeh, S. *et al.* Obstructive sleep apnea and aging effects on macrovascular and microcirculatory function. *Sleep* **33**, 1177–1183 (2010).
551. Nieto, F. J., Herrington, D. M., Redline, S., Benjamin, E. J. & Robbins, J. A. Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 354–360 (2004).
552. Yim-Yeh, S. *et al.* Vascular dysfunction in obstructive sleep apnea and type 2 diabetes mellitus. *Obesity (Silver Spring)*. **19**, 17–22 (2011).
553. Chami, H. A. *et al.* Brachial artery diameter, blood flow and flow-mediated dilation in sleep-disordered breathing. *Vasc. Med.* **14**, 351–360 (2009).
554. Weaver, T. E. & Sawyer, A. M. Adherence to continuous positive airway pressure treatment for obstructive sleep apnoea: implications for future interventions. *Indian J. Med. Res.* **131**, 245–258 (2010).
555. Rochefort, G. Y. *et al.* Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* **24**, 2202–2208 (2006).
556. Carreras, A., Almendros, I., Montserrat, J. M., Navajas, D. & Farre, R. Mesenchymal stem cells reduce inflammation in a rat model of obstructive sleep apnea. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **172**, 210–212 (2010).
557. Riera Del Moral, L. *et al.* Experimental model for adjuvant treatment with mesenchymal stem cells for aortic aneurysm. *Am. J. Stem Cells* **1**, 174–181 (2012).
558. Schneider, F. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells stabilize already-formed aortic aneurysms more efficiently than vascular smooth muscle cells in a rat model. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **45**, 666–672 (2013).
559. Sharma, A. K. *et al.* Experimental abdominal aortic aneurysm formation is mediated by IL-17 and attenuated by mesenchymal stem cell treatment. *Circulation* **126**, S38–45 (2012).
560. Fu, X. *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells prevents angiotensin II induced aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mouse. *J. Transl. Med.* **11**, 175 (2013).
561. Hashizume, R., Yamawaki-Ogata, A., Ueda, Y., Wagner, W. R. & Narita, Y. Mesenchymal stem cells attenuate angiotensin II-induced aortic aneurysm growth in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Vasc. Surg.* **54**, 1743–1752 (2011).
562. Zhang, J. *et al.* The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 234 (2015).
563. Kupcova Skalnikova, H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* **95**, 2196–2211 (2013).
564. Gay-Jordi, G. *et al.* Losartan prevents heart fibrosis induced by long-term intensive exercise in an animal model. *PLoS One* **8**, e55427 (2013).
565. Pluim, B. M., Zwinderman, A. H., van der Laarse, A. & van der Wall, E. E. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* **101**, 336–344 (2000).
566. Verzola, R. M. M. *et al.* Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**, 621–627 (2006).
567. Chen, Y. *et al.* Cardiac troponin T alterations in myocardium and serum of rats after stressful, prolonged intense exercise. *J. Appl. Physiol.* **88**, 1749–1755 (2000).
568. Wilson, M. *et al.* Diverse patterns of myocardial fibrosis in lifelong, veteran endurance athletes. *J. Appl. Physiol.* **110**, 1622–1626 (2011).
569. Mont, L. *et al.* Long-lasting sport practice and lone atrial fibrillation. *Eur. Heart J.* **23**, 477–482 (2002).
570. Sanchis-Gomar, F. *et al.* Atrial fibrillation in highly trained endurance athletes ??? Description of a syndrome. *Int. J. Cardiol.* **226**, 11–20 (2017).
571. Burstein, B. *et al.* Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ. Res.* **105**, 1213–1222 (2009).
572. Li, D., Fareh, S., Leung, T. K. & Nattel, S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* **100**, 87–95 (1999).
573. D'Ascenzi, F. *et al.* Characterization of right atrial function and dimension in top-level athletes: a speckle tracking study. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **29**, 87–94 (2013).
574. D'Ascenzi, F. *et al.* Morphological and functional adaptation of left and right atria induced by training in highly trained female athletes. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **7**, 222–229 (2014).
575. Dawson, E., George, K., Shave, R., Whyte, G. & Ball, D. Does the human heart fatigue subsequent to prolonged exercise? *Sports Med.* **33**, 365–380 (2003).
576. Sadoshima, J. & Izumo, S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ. Res.* **73**, 413–423 (1993).
577. Campbell, S. E. & Katwa, L. C. Angiotensin II

- stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1947–1958 (1997).
578. Sharma, H. S., van Heugten, H. A., Goedbloed, M. A., Verdouw, P. D. & Lamers, J. M. Angiotensin II induced expression of transcription factors precedes increase in transforming growth factor-beta 1 mRNA in neonatal cardiac fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 105–112 (1994).
579. Rahmutula, D. *et al.* Molecular basis of selective atrial fibrosis due to overexpression of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Cardiovasc. Res.* **99**, 769–79 (2013).
580. Abbott, D. *et al.* Preclinical safety profile of sildenafil. *Int. J. Impot. Res.* **16**, 498–504 (2004).
581. Schermuly, R. T. *et al.* Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 39–45 (2004).
582. Itoh, T. *et al.* A combination of oral sildenafil and beraprost ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 34–38 (2004).
583. Hassan, M. A. H. & Ketat, A. F. Sildenafil citrate increases myocardial cGMP content in rat heart, decreases its hypertrophic response to isoproterenol and decreases myocardial leak of creatine kinase and troponin T. *BMC Pharmacol.* **5**, 10 (2005).
584. Kim, K. H. *et al.* Long-term effects of sildenafil in a rat model of chronic mitral regurgitation: Benefits of ventricular remodeling and exercise capacity. *Circulation* **125**, 1390–1401 (2012).
585. Gong, W. *et al.* Chronic inhibition of cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase 5 prevented cardiac fibrosis through inhibition of transforming growth factor  $\beta$ -induced Smad signaling. *Front. Med.* **8**, 445–55 (2014).
586. Patrucco, E. *et al.* Roles of cGMP-dependent protein kinase I (cGKI) and PDE5 in the regulation of Ang II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12925–12929 (2014).
587. Buxton, I. L. O. & Duan, D. Cyclic GMP/protein kinase G phosphorylation of Smad3 blocks transforming growth factor-beta-induced nuclear Smad translocation: a key antifibrogenic mechanism of atrial natriuretic peptide. *Circ. Res.* **102**, 151–3 (2008).
588. Li, P. *et al.* Factor  $\beta$  – Induced Smad Signaling and Myofibroblast Transformation in Mouse Cardiac Fibroblasts. *Circ. Res.* (2008). doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.157677
589. Chau, V. Q., Salloum, F. N., Hoke, N. N., Abbate, A. & Kukreja, R. C. Mitigation of the progression of heart failure with sildenafil involves inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H2272–9 (2011).
590. Takimoto, E. Cyclic GMP-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes. *Circ. J.* **76**, 1819–1825 (2012).
591. Sperandio, P. a *et al.* Sildenafil improves microvascular O2 delivery-to-utilization matching and accelerates exercise O2 uptake kinetics in chronic heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **303**, H1474–80 (2012).
592. Schäfer, S. *et al.* Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodelling. *Cardiovasc. Res.* **82**, 30–39 (2009).
593. Kasai, T., Floras, J. S. & Bradley, T. D. Sleep apnea and cardiovascular disease: a bidirectional relationship. *Circulation* **126**, 1495–1510 (2012).
594. Iwasaki, Y. *et al.* Determinants of atrial fibrillation in an animal model of obesity and acute obstructive sleep apnea. *Heart Rhythm* **9**, 1409–16.e1 (2012).
595. Simpson, J. A., Brunt, K. R. & Iscoe, S. Repeated inspiratory occlusions acutely impair myocardial function in rats. *J. Physiol.* **586**, 2345–2355 (2008).
596. Hanna, N., Cardin, S., Leung, T.-K. & Nattel, S. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc. Res.* **63**, 236–244 (2004).
597. Nakajima, H. *et al.* Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circ. Res.* **86**, 571–579 (2000).
598. Burstein, B., Libby, E., Calderone, A. & Nattel, S. Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences. *Circulation* **117**, 1630–1641 (2008).
599. Xiao, H. D. *et al.* Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am. J. Pathol.* **165**, 1019–1032 (2004).
600. Van Linthout, S. *et al.* Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.* **103**, 319–327 (2008).
601. Garvey, J. F., Taylor, C. T. & McNicholas, W. T. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation. *Eur. Respir. J.* **33**, 1195–1205 (2009).
602. Melendez, G. C. *et al.* Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* **56**, 225–231 (2010).
603. van den Akker, F., Deddens, J. C., Doevendans, P. A. & Sluijter, J. P. G. Cardiac stem cell therapy to modulate inflammation upon myocardial infarction. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 2449–2458 (2013).
604. Iyer, S. S. & Rojas, M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin. Biol. Ther.* **8**, 569–581 (2008).
605. Li, L. *et al.* Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol. Biol. Rep.* **36**, 725–731 (2009).
606. Ortiz, L. A. *et al.* Mesenchymal stem cell

- engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8407–8411 (2003).
607. Ninichuk, V. *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int.* **70**, 121–129 (2006).
608. Wu, Y. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int. Wound J.* **11**, 701–710 (2014).
609. Iwamoto, T. *et al.* Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice. *Cell Tissue Res.* **351**, 487–495 (2013).
610. Mias, C. *et al.* Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells* **27**, 2734–2743 (2009).
611. Mao, Q., Lin, C.-X., Liang, X.-L., Gao, J.-S. & Xu, B. Mesenchymal stem cells overexpressing integrin-linked kinase attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *Mol. Med. Rep.* **7**, 1617–1623 (2013).





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**B:KC** Barcelona  
Knowledge  
Campus

**HUB<sup>C</sup>** Health Universitat de  
Barcelona  
Campus