



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

*Impacto del entrenamiento aeróbico sobre las alteraciones
mitocondriales en un modelo de hipertrofia cardiaca patológica: rol
de IGF-1 y apelina*

Tesista: Lic. Godoy Coto, Joshua

Directora: Dra. Ennis, Irene L.

Codirectora: Dra. Yeves, Alejandra M.

Año: 2023



CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES

Dr. Horacio E. Cingolani

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares “Dr. Horacio E. Cingolani” de la Facultad de Ciencias Médicas de la misma universidad, bajo la dirección de la Dra. Irene L. Ennis y la codirección de la Dra. Alejandra M. Yeves.

Agradecimientos

A mi directora y codirectora por su guía, consejos y acompañamiento estos años, así como la oportunidad, la libertad y la confianza depositada en mí.

A los integrantes del Centro de Investigaciones Cardiovasculares, por los consejos, los préstamos y discusiones científicas y no tan científicas.

A los becarios por las catarsis, risas y comprensión.

A las personas libres y de buenas costumbres por su fraternidad.

A mi familia elegida por ser mi red de soporte, los momentos vividos, las experiencias compartidas, las risas, las salidas, las discusiones, los éxitos y las felicidades.

A mi familia por estar presentes y ayudarme a pesar de la distancia y sin ellos esto no hubiese sido posible

Índice general

Agradecimientos	3
Índice general	4
Índice de figuras y tablas	7
Resumen	10
Congresos y publicaciones relacionadas a este trabajo de tesis	12
Congresos	12
Publicaciones (actualmente enviadas y en etapa de revisión).....	13
Abreviaturas	14
1. Introducción	16
1.1 Hipertensión arterial.....	16
1.2 Relevancia epidemiológica	18
1.3 Estrategias para combatir la hipertensión arterial	19
1.4 Hipertensión como inductor de hipertrofia cardíaca	20
1.5 Actividad física, ejercicio y entrenamiento.....	25
1.6 Efectos agudos y crónicos del ejercicio en el sistema cardiovascular.	26
1.7 Hipertrofia cardíaca fisiológica.....	30
1.8 Reversión no farmacológica del remodelado patológico	32
1.9 Balance redox en el miocardio hipertrófico hipertensivo.....	33
1.10 Mitocondrias miocárdicas.....	34
1.11 Fuerza protón motriz, pH y potencial de membrana mitocondrial	35
1.12 Dinámica mitocondrial	37
1.12.1 Fusión	38
1.12.2 Fisión.....	39
1.12.3 Biogénesis	40
1.12.4 Mitofagia	41
1.12.5 Dinámica mitocondrial en cardiomiocitos adultos.....	42
1.13 Mitocondrias y producción de ROS.....	43
1.14 Relación entre el Ca ²⁺ y las mitocondrias	45
1.15 Rol de la cardiolipina y otros lípidos en la función mitocondrial.....	46
1.16 IGF-1/IGF1R – vía cardioprotectora.....	48
1.17 Apelina/APJ – vía cardioprotectora.....	49

2. Objetivos.....	51
2.1 Objetivo general.....	51
2.2 Objetivos específicos.....	51
3. Materiales y métodos	53
3.1 Protocolo de entrenamiento	53
3.2 Sacrificio de animales y toma de muestras	54
3.3 Valores morfométricos del modelo	55
3.4 Toma de presión arterial.....	55
3.5 Ecocardiografía	55
3.6 Electrocardiograma.....	57
3.7 Microscopía electrónica de transmisión	57
3.8 Cuantificación de parámetros morfológicos mitocondriales	58
3.9 Cuantificación del grado de ordenamiento mitocondrial.....	59
3.10 Aislamiento de mitocondrias miocárdicas	62
3.11 Estimación del potencial de membrana mitocondrial.....	63
3.12 Capacidad de retención de Ca ²⁺	63
3.13 Contenido de Ca ²⁺ mitocondrial	64
3.14 Ensayo de hinchamiento mitocondrial.....	64
3.15 Extracción de lípidos mitocondriales	65
3.16 Cromatografía de capa fina de alta performance (HP-TLC)	65
3.17 Acidificación de la matriz mitocondrial	66
3.18 Contenido mitocondrial de ATP	66
3.19 Extracción de ADN.....	67
3.20 Extracción de ARN.....	67
3.21 Transcripción reversa.....	68
3.22 PCR cuantitativa en tiempo real	68
3.23 Cuantificación de proteínas totales	69
3.24 Producción de ROS en ventrículo izquierdo y mitocondrias aisladas	70
3.25 Actividad de citrato sintasa.....	70
3.26 Actividades de superóxido dismutasas 1 y 2	71
3.27 Actividad de catalasa.....	72
3.28 Western blot.....	72
3.29 Aislamiento de cardiomiocitos adultos	74
3.30 Medidas de ROS y $\Delta\Psi_m$ en cardiomiocitos aislados.....	74
3.31 Análisis estadístico, gráficos y esquemas	75

4. Resultados	76
4.1 Valores morfométricos y controles del protocolo de entrenamiento	76
4.2 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre los valores de la presión arterial y la masa y función cardíacas.....	77
4.3 Entrenamiento aeróbico y marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca.....	85
4.4 Entrenamiento aeróbico y ultraestructura miocárdica.....	87
4.5 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la dinámica mitocondrial.....	91
4.6 Efectos del entrenamiento aeróbico en la integridad y función mitocondrial.....	92
4.7 Efecto del entrenamiento aeróbico sobre los lípidos mitocondriales	97
4.8 Entrenamiento aeróbico y manejo de Ca ²⁺ mitocondrial	99
4.9 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre los niveles de O-Gluco-N-Acetilación mitocondriales.....	101
4.10 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el estrés oxidativo.....	103
4.11 Efectos del entrenamiento sobre los intercambiadores iónicos sarcolemales y mitocondriales.....	106
4.12 Rol de las vías cardioprotectoras IGF1/IGF1R y Apelina/APJ en las adaptaciones miocárdicas inducidas por el entrenamiento	108
4.13 Efectos agudos de IGF-1 y apelina en cardiomiocitos SHR.....	112
5. Discusión y conclusiones	119
5.1 Efectos del entrenamiento aeróbico en la función cardiovascular	119
5.2 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la hipertrofia del miocardio hipertensivo	121
5.3 El entrenamiento aeróbico mejora el estado redox del miocardio hipertensivo ..	123
5.4 La ultraestructura del cardiomiocito como blanco del entrenamiento aeróbico	125
5.5 Entrenamiento aeróbico y la función mitocondrial	127
5.6 El entrenamiento aeróbico promueve un mecanismo de restauración mitocondrial	130
5.7 Vías responsables de las adaptaciones al entrenamiento aeróbico.....	132
5.8 Conclusiones parciales.....	138
5.9 Conclusión	140
6. Bibliografía	142
7. Anexos	171
7.1 Anexo A: macro de preprocesamiento de imágenes para MET	171
7.2 Anexo B: macro para determinación de GSE.....	172

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Ley de Laplace. Respuesta del miocardio ante la sobrecarga hemodinámica.	22
Figura 2. Vía de señalización estimulada por el estiramiento mecánico en cardiomiocitos	24
Figura 3. Hipótesis del ejercicio extremo	26
Figura 4. Efectos del sistema nervioso simpático sobre el corazón	28
Figura 5. Esquema mitocondrial.....	36
Figura 6. Esquema de los procesos vinculados a la dinámica mitocondria y algunos de sus marcadores.....	38
Figura 7. Esquema de la producción de O_2^- en la cadena transportadora de electrones.....	44
Figura 8. Protocolo de entrenamiento	54
Figura 9. Flujo de trabajo de preprocesamiento de imágenes de microscopía electrónica de transmisión.	58
Figura 10. Esquema de valores morfométricos cuantificados en las regiones de interés en imágenes de microscopía electrónica de transmisión.	59
Figura 11. Esquema de trabajo para la determinación de la cantidad de vecinos por mitocondria.	60
Figura 12. Determinación de agrupamientos mitocondriales con el plugin SSIDC Cluster Indicator.	61
Tabla 1. Genes, secuencias utilizadas como primers y longitud del amplicón.	69
Tabla 2. Valores morfométricos y control de entrenamiento y estrés del modelo.....	77
Figura 13. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la masa miocárdica y la presión arterial. .	79
Tabla 3. Parámetros ecocardiográficos	80
Figura 14. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre parámetros ecocardiográficos.....	81
Figura 15. Registros representativos del electrocardiograma	83
Figura 16. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre parámetros electrocardiográficos.....	84
Figura 17. Efectos del entrenamiento sobre los marcadores de hipertrofia cardíaca patológica.	86

Figura 18. Morfometría de las mitocondrias miocárdicas	88
Figura 19. Cambios en el ordenamiento mitocondrial.....	90
Figura 20. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la dinámica mitocondrial	92
Figura 21. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la integridad mitocondrial.....	93
Figura 22. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la enzima citrato sintasa.....	94
Figura 23. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre los componentes de la fuerza protón motriz	95
Figura 24. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el consumo de O ₂	96
Figura 25. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el contenido y producción de ATP.	96
Figura 26. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre los lípidos mitocondriales.....	98
Figura 27. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el hinchamiento de la matriz mitocondrial.	100
Figura 28. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la capacidad de retención y contenido de Ca ²⁺ mitocondrial.....	101
Figura 29. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la O-Gluco-N-Acetilación mitocondrial.	102
Figura 30. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el estado redox miocárdico.....	104
Figura 31. Producción de ROS en mitocondrias aisladas.....	105
Figura 32. Expresión relativa de distintos transportadores iónicos.....	107
Figura 33. Componentes de las vías de señalización involucradas en las adaptaciones del entrenamiento aeróbico.....	110
Figura 34. Vía apelina/APJ y entrenamiento aeróbico en el miocardio hipertensivo.....	111
Figura 35. Producción de ROS en cardiomiocitos aislados de SHR expuestos a distintas concentraciones de H ₂ O ₂	112
Figura 36. Velocidad de producción de ROS en cardiomiocitos aislados de SHR pretratados con IGF-1 10 nM y/o AG1024 100nM ante distintos estímulos.	113
Tabla 4. Velocidad de producción de ROS en cardiomiocitos aislados de SHR pretratados con IGF-1 10nM y/o AG1024 100 nM con distintos estímulos	114
Figura 37. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en cardiomiocitos aislados pretratados con IGF-1 10 nM y/o AG1024 100 nM ante distintos estímulos	115

Figura 38. Efectos de la inhibición de las vías de IGF-1 y apelina sobre la producción de ROS y el $\Delta\Psi_m$ frente estímulo oxidativo (H_2O_2 100 μM). 117

Figura 39. Esquema de la vía de señalización intracelular propuesta en esta tesis doctoral 135

Figura 40. Resumen gráfico de los principales resultados obtenidos en esta tesis doctoral. ... 141

Resumen

La hipertensión arterial es uno de los factores de riesgo cardiovascular modificables más importante y es el principal contribuyente a las tasas de morbimortalidad a nivel mundial. Puntualmente en Argentina, un estudio realizado por la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial en el 2019 arrojó que el 50% de los adultos presenta cifras de presión arterial elevada, de ellos la mitad no estaba al tanto, y por lo tanto no estaban siendo tratados, ni mucho menos con la presión arterial controlada. Ante esta sobrecarga de presión mantenida en el tiempo, el corazón responde iniciando un programa pro-hipertrófico que le permite enfrentar en mejores condiciones el aumento de trabajo. Uno de los principales inconvenientes con este programa es el punto de partida patológico. En el que, por ejemplo, el crecimiento de los cardiomiocitos no se ve acompañado de un aumento de la vascularización, lo que termina generando un desequilibrio en el tejido produciendo daño celular que, a largo plazo, puede conducir al desarrollo de insuficiencia cardíaca.

Por otro lado, el entrenamiento aeróbico también representa una sobrecarga de trabajo para el corazón y, si es mantenido en el tiempo, es capaz de poner en marcha un mecanismo pro-hipertrófico fisiológico, en el cual todos los componentes celulares aumentan proporcionalmente. El entrenamiento aeróbico a través de la liberación sistémica y miocárdica de moléculas como el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) y apelina promueve el desarrollo de un fenotipo cardioprotector, aunque los mecanismos moleculares no han sido dilucidados completamente. Por ejemplo, se desconoce si el IGF-1 y la apelina son eslabones de una misma cadena de señalización intracelular beneficiosa, así como los blancos intracelulares específicos de cada uno de estos factores.

Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que el entrenamiento aeróbico es capaz de generar un remodelado cardíaco reverso, es decir convertir el fenotipo hipertrófico patológico en uno fisiológico. Sin embargo, no se ahondó en gran medida en los mecanismos subcelulares involucrados.

En esta tesis doctoral se estudió el efecto adaptativo de una rutina de ejercicio aeróbico sobre las alteraciones cardíacas de corazones de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Estuvimos particularmente interesados en investigar los efectos a nivel mitocondrial, tales como la dinámica mitocondrial, los mecanismos de producción y/o eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS), el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la producción de ATP. Además, exploramos si ocurre la activación de las vías de señalización de IGF-1 o apelina que pueden ser responsables de los efectos mitocondriales observados en el entrenamiento; y particularmente, en experimentos *in vitro*, el efecto de estas moléculas sobre las mitocondrias de cardiomiocitos provenientes de animales hipertensos. Para ello se utilizaron SHR macho adultos en dos modelos experimentales: 1) *in vivo*: incorporadas a una rutina de natación durante 8 semanas y 2) *in vitro*: cardiomiocitos aislados expuestos en forma aguda a IGF-1 o apelina.

Nuestros resultados indican que el entrenamiento aeróbico promovió: 1) mejoras en la función cardíaca, a pesar de no normalizar la presión arterial; 2) un programa de restauración mitocondrial mediante cambios en su organización y dinámica; 3) la recomposición del balance redox; 4) la correcta función y capacidad de producir energía de las mitocondrias miocárdicas; y 5) la activación de la vía IGF1R-APJ/AKT/GSK3- β /PGC1- α , que podría ser la responsable de los cambios beneficiosos observados. Por su parte, los experimentos *in vitro* sugieren que el IGF-1 y la apelina comparten una misma vía de señalización intracelular, en la que existiría algún tipo de intercomunicación y regulación entre ambos receptores, contribuyendo al efecto antioxidante y estabilizador del $\Delta\Psi_m$, al menos frente a insultos oxidantes.

Congresos y publicaciones relacionadas a este trabajo de tesis

Congresos

1. "A swimming routine improves cardiac mitochondrial phenotype in spontaneously hypertensive rats." Godoy Coto, J; Cavalli, F; Caldiz, CI; Yeves, AM; Ennis, IL. Reunión Conjunta SAIC SAI SAFIS 2018. Mar del Plata, Argentina.
2. "Mitochondrial adaptations induced by swimming in the myocardium of spontaneously hypertensive rats: role of igf-1 and apelin." Yeves, AM; Godoy Coto, J; Cavalli, F; Pereyra, EV; Caldiz, CI; Ennis, IL. 2019 ESH summer school. Atenas, Grecia.
3. "Adaptaciones mitocondriales inducidas por una rutina de natación en el miocardio de ratas espontáneamente hipertensas (SHR): rol del IGF-1 y apelin." Godoy Coto, J; Cavalli, F; Pereyra, EV; Caldiz, CI; Yeves, AM; Ennis, IL. XXXVII Congreso Argentino de Cardiología FAC 2019. Rosario, Argentina.
4. "Apelina e IGF-1 como mediadores del fenotipo mitocondrial cardiaco inducido por una rutina de natación en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)." Godoy Coto, J; Cavalli, F; Pereyra, EV; Caldiz, CI; Yeves, AM; Ennis, IL. XXVI Congreso Mar del Plata SAHA 2019. Mar del Plata, Argentina.
5. "Aerobic training-induced mitochondrial adaptations in hypertensive myocardium." Godoy Coto, J; Pereyra, EV; Yeves, AM; Ennis, IL. Reunión Anual de Sociedades de Biociencias 2020. Buenos Aires, Argentina.
6. "Aerobic Training Improves Hypertensive- Myocardium Mitochondria" Godoy Coto, J; Cavalli, F; Pereyra, EV; Caldiz, CI; Yeves, AM; Ennis, IL. Experimental Biology 2021 Meeting. Rockville, Estados Unidos de América.
7. "Aerobic Training Improves Hypertensive- Myocardium Mitochondria". Godoy Coto, Joshua; Pereyra, Erica; Cavalli, Fiorella; Caldiz, Claudia; Yeves, Alejandra; Ennis, Irene. The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Estados Unidos: FASEB Office of Publications. 2021. 0892-6638.

8. "Mitochondrial and contractile function improvement induced by aerobic training in hypertensive rat myocardium." Godoy Coto, Joshua; Pereyra, Erica; Cavalli, Fiorella; Caldiz, Claudia; Yeves, Alejandra; Ennis, Irene. Journal of molecular and cellular cardiology, Estados Unidos: Journal of molecular and cellular cardiology. 2022.
9. "El entrenamiento aeróbico como mito-potenciador en un modelo de hipertensión arterial esencial". Godoy Coto, J; Cavalli, F; Pereyra, EV; Caldiz, CI; Yeves, AM; Ennis, IL. Revista de la Federación Argentina de Cardiología, Argentina: Federación Argentina de Cardiología. 2023.
10. "Cardiac mitochondrial modifications induced by training in SHR." Godoy Coto J, Pereyra EV, Ennis IL. Congreso anual SAFIS 2023. Buenos Aires, Argentina.
11. "Myocardial IGF-1 targets in acute and chronic treatment of hypertensive rats." Godoy Coto J, Pereyra EV, Ennis IL. Congreso anual SAFIS 2023. Buenos Aires, Argentina.

Publicaciones (actualmente enviadas y en etapa de revisión)

1. Mitochondrial adaptations in exercise-induced cardiac reverse remodeling of hypertrophied rat hearts. En revisión para su publicación. Joshua Godoy Coto, Erica V. Pereyra, Fiorella A. Cavalli, Carlos A. Valverde, Sabina M. Mate, Claudia I. Caldiz, Alejandra M. Yeves, Irene L. Ennis. 2024. Enviado a Pflügers Archiv - European Journal of Physiology (Aceptado y en prensa a marzo 2024).
2. The apelin/APJ signaling is critically involved in the acute mitochondrial and antioxidant effects of exogenous IGF-1 in the myocardium of SHR. Manuscrito en preparación. Alejandra M. Yeves, Joshua Godoy Coto, Luisa González Arbeláez, Fiorella A. Cavalli, Claudia I. Caldiz, Irene L. Ennis. 2024. Enviado a Archives of Biochemistry and Biophysics.

Abreviaturas

- ∴ ADP: adenosina difosfato
- ∴ AKT: o PKB, proteína quinasa B, codificada por los genes AKT.
- ∴ Ang-II: angiotensina II
- ∴ ANT: transportador de nucleótidos de adenina
- ∴ APJ: receptor de apelina
- ∴ ATP: adenosina trifosfato
- ∴ CaMKII: calcio calmodulina quinasa II
- ∴ cAMP: adenosina monofosfato cíclica
- ∴ CCM: contenido de Ca^{2+} mitocondrial
- ∴ cGMP: guanosina monofosfato cíclica
- ∴ CHE: intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$
- ∴ CL: cardiolipina
- ∴ CTE: cadena transportadora de electrones
- ∴ CytC: citocromo C
- ∴ DRP1: proteína relacionada a la dinamina 1 / *dynammin-related protein 1*
- ∴ ECA: enzima convertidora de angiotensina
- ∴ ECG: electrocardiograma
- ∴ eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
- ∴ ERK1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares isoformas 1/2
- ∴ ET-1: endotelina 1
- ∴ FADH2: flavín adenín dinucleótido
- ∴ Fis1: la proteína de fisión mitocondrial 1
- ∴ FPM: fuerza protón motriz
- ∴ GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica
- ∴ GSE: entropía global de Shannon
- ∴ IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1
- ∴ IGF1R: receptor de IGF-1
- ∴ iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
- ∴ MAMs: membranas del retículo asociadas a mitocondrias
- ∴ MCU: uniportador de Ca^{2+} mitocondrial
- ∴ MET: microscopía electrónica de transmisión
- ∴ MFF: factor de fisión mitocondrial
- ∴ MFN1: mitofusina 1 / *mitofusin 1*
- ∴ MFN2: mitofusina 2 / *mitofusin 2*
- ∴ MICOS: sistema de organización de crestas y sitios de contacto mitocondriales

- ∴ mPTP: poro de permeabilidad transitoria mitocondrial
- ∴ NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
- ∴ NBCe1: intercambiador $\text{Na}^+ / 2\text{HCO}_3^-$ electrogénico
- ∴ NBCn1: intercambiador $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ electroneutro
- ∴ NCLX: intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Li}^+ / \text{Ca}^{2+}$ mitocondrial
- ∴ NCX: intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$
- ∴ NHE-1: intercambiador Na^+ / H^+ 1
- ∴ nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal
- ∴ NO: óxido nítrico
- ∴ O-GlcNAc: O-gluco-N-acetilación
- ∴ OGT: O-GlcNAc transferasa
- ∴ OGA: O-GlcNAc acetilasa
- ∴ PA: ácido fosfatídico
- ∴ PAS: presión arterial sistólica
- ∴ PC: fosfatidilcolina
- ∴ PE: fosfatidiletanolamina
- ∴ PG: fosfatidilglicerol
- ∴ PGC1- α : coactivador 1- α del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas
- ∴ P_i : fosfato inorgánico
- ∴ PI3K: fosfoinositol 3 quinasa
- ∴ PINK-1: proteínas quinasa 1 inducida por PTEN
- ∴ PKA: proteinquinasa A
- ∴ PLC: fosfolipasa C
- ∴ PS: fosfatidilserina
- ∴ QH_2 : coenzima Q reducida
- ∴ ROS: especies reactivas del oxígeno / *reactive oxygen species*
- ∴ RyR2: receptor de rianodina 2
- ∴ SHR: ratas espontáneamente hipertensas
- ∴ SOD1: Cu/Zn-superóxido dismutasa o superóxido dismutasa 1
- ∴ SOD2: Mn-superóxido dismutasa o superóxido dismutasa 2
- ∴ TRPC: canales de potencial de receptor transitorio
- ∴ VDAC: canal voltaje dependiente de aniones

1. Introducción

1.1 Hipertensión arterial

La hipertensión arterial se puede definir como un aumento sostenido en la presión que ejerce la sangre sobre las paredes de las arterias, de etiología no completamente conocida, que aumenta el riesgo de eventos perjudiciales a nivel cerebral, renal, cardíaco y vascular en general. La presión arterial está definida como el producto del gasto cardíaco y la resistencia periférica, por lo que la hipertensión puede estar causada por el aumento de uno o ambos factores ¹. El gasto cardíaco, a su vez, está determinado por la frecuencia cardíaca y el volumen sistólico, siendo este último dependiente de la contractilidad del miocardio, del tamaño de la cámara y de la tensión de la pared ventricular al final de la diástole y al inicio de la sístole. Por otro lado, la resistencia periférica está fundamentalmente determinada por cambios anatómicos y funcionales de arterias y arteriolas relacionados con su calibre y la distensibilidad.

La hipertensión arterial esencial generalmente se asocia con otros factores que incrementan el riesgo cardiovascular, como predisposiciones genéticas, el envejecimiento, el sedentarismo, el sobrepeso, la insulinoresistencia y la diabetes mellitus, entre otras ^{1,2}; lo que explica su gran preponderancia en adultos e incluso, aunque alarmante, en niños. Anteriormente se consideraba que el aumento de la presión arterial en los individuos hipertensos ocurría como un mecanismo compensatorio para mantener la correcta perfusión de los órganos. Sin embargo, diversos ensayos clínicos han demostrado que la reducción de la presión arterial reduce la morbimortalidad de los pacientes con cualquier grado de hipertensión, incluso en pacientes que no son hipertensos, pero en los que están presentes otros de factores de riesgo cardiovascular ^{2,3}.

Si bien se conocen los factores que pueden contribuir al desarrollo o mala prognosis de la hipertensión, los mecanismos fisiopatológicos relacionados a la enfermedad permanecen sin ser dilucidados. Sin embargo, la incidencia es cada vez

mayor y el tratamiento a largo plazo suele ser deficiente, por lo que el estudio de las bases moleculares y celulares posee una vital importancia.

Dentro de las posibles causas fisiopatológicas se encuentran la aparición de mutaciones en algunos genes vinculados con mecanismos renales, neurales, endócrinos y vasculares de control de la presión arterial ⁴. Siendo estas mutaciones aditivas, contribuyendo en una pequeña parte al aumento o disminución de la presión arterial.

Otro componente puede ser la hiperactivación del sistema nervioso simpático por estrés físico y/o emocional ⁵, consecuencia de la sociedad moderna occidental, la cual produce un aumento de la frecuencia y del gasto cardíacos, así como de la resistencia periférica principalmente por los aumentos de los niveles de noradrenalina circulantes que promueven la vasoconstricción generalizada.

Una causa de gran relevancia clínica está vinculada con un desequilibrio entre los mecanismos renales de extrusión/reabsorción de Na^+ y su ingesta en la dieta. El aumento en los niveles circulantes de Na^+ produce un aumento de la osmolaridad del plasma, que genera el consecuente movimiento de agua desde los compartimentos intracelulares hacia el intravascular. Esto produce un aumento de la volemia y de la precarga, lo que aumenta el gasto cardíaco por el mecanismo de Frank-Starling. El riñón, en personas normotensas, ante un aumento fisiológico del Na^+ plasmático aumenta su excreción junto con la de agua, lo que disminuye la volemia, compensando así el aumento de la presión arterial. En la hipertensión o ante la ingesta excesiva de Na^+ el riñón no es capaz de reducir la presión arterial a valores normales ⁶.

Otro posible mecanismo que puede contribuir a la hipertensión es la disfunción endotelial. Un endotelio sano produce dos moléculas principales para controlar el tono vascular y la presión arterial, el óxido nítrico (NO) y la endotelina 1 (ET-1), un vasodilatador y un vasoconstrictor, respectivamente. Un endotelio disfuncional está caracterizado por la disminución en la producción de NO, el aumento en la producción de ET-1, además de cambios en la liberación de factores proinflamatorios

¹. Estos efectos están mediados, al menos en parte, por un desequilibrio redox volcado hacia el estrés oxidativo que inactiva las enzimas que producen NO.

Por último, otra de las principales causas de la hipertensión es la alteración del sistema renina/angiotensina/aldosterona. Este sistema tiene como principal consecuencia aumentar la presión arterial por los efectos vasoconstrictores de la Angiotensina II (Ang-II) y el aumento de la reabsorción renal de Na⁺ inducido por la aldosterona y la Ang-II ⁷. Pacientes con hipertensión suelen presentar niveles aumentados de renina en plasma, lo que los predispone a tener valores de presión arterial elevados ⁸.

Todas las distintas causas mencionadas anteriormente hacen que encontrar el responsable de que un paciente sufra de hipertensión sea sumamente difícil, sumado a que frecuentemente coexisten diversas alteraciones, posiblemente interconectadas entre sí o incluso puede coexistir alguna comorbilidad extra como el sedentarismo, sobrepeso u otras que contribuya a complejizar el panorama. En definitiva, la hipertensión arterial es una entidad clínica de alta predominancia en la población en general que, como se explicará más adelante, puede conducir al desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica, tema de estudio de esta tesis, seguida de insuficiencia cardíaca, daño en otros órganos blanco y muerte, si no es correctamente tratada y controlada.

1.2 Relevancia epidemiológica

La hipertensión arterial es uno de los factores de riesgo cardiovascular modificables más importantes y el principal contribuyente a las tasas de morbimortalidad a nivel mundial ⁹. En un estudio publicado en 2017 en el cual se incluyeron a 8,69 millones de participantes provenientes de 154 países, se estimó que entre 1990 y 2015 la cantidad de pacientes con valores de presión arterial sistólica de al menos 110 mm Hg aumentó del 73,1 al 81,3 % y aquellos con valores de al menos 140 mm Hg aumentó de 17,3 a 20,5% ¹⁰. Puntualmente en Argentina, un estudio transversal multicéntrico arrojó que el 50% de los adultos presenta cifras de

presión arterial más elevadas que las consideradas normales, de ellos la mitad lo desconocía, y por lo tanto no estaban medicados, ni mucho menos con la presión arterial controlada ¹¹.

La evidencia epidemiológica sugiere que existe una interrelación entre los valores de presión arterial y otros factores de riesgo que promueven el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Además, solo una minoría de los pacientes hipertensos tiene solamente valores elevados de presión arterial, la mayoría en cambio exhibe otros factores de riesgo cardiovascular asociados, como tabaquismo, alcoholismo, sedentarismo y obesidad, entre otros. Cuando esto sucede, el riesgo cardiovascular excede al que sería previsible de la mera suma del riesgo atribuible a cada uno de los factores de riesgo presentes. En otras palabras, por ejemplo, personas con valores no tan elevados de presión arterial, pero con varios otros factores de riesgo cardiovascular tienen más riesgo general de desarrollar alguna enfermedad cardiovascular que personas medianamente hipertensas con ninguno de estos otros factores asociados. Por lo tanto, tratamientos o estrategias que reduzcan los factores de riesgo pueden tener efectos beneficiosos no solo para las personas hipertensas, sino también para aquellas normotensas ¹².

El aumento en la prevalencia de personas con valores de presión arterial altos, su bajo reconocimiento en la población, la falta de correcto control de la hipertensión arterial, sumado al estilo de vida moderno poco saludable -sedentarismo, consumo excesivo de alimentos ultra procesados, entre otros- representan un verdadero problema para la salud pública a nivel mundial, por lo cual es imprescindible fomentar con urgencia estrategias destinadas a reducir las cifras tensionales en la población, así como los daños en órganos blanco que ésta provoca.

1.3 Estrategias para combatir la hipertensión arterial

Dentro de las posibles estrategias para evitar el aumento en la presión arterial en la población existen dos frentes: uno farmacológico y otro comportamental. El primero cuenta con gran desarrollo por parte de la industria farmacéutica y con

marcados efectos beneficiosos en la calidad de vida de los pacientes. Dentro de los fármacos más utilizados están los diuréticos tiazídicos, β -bloqueantes, antagonistas del receptor de Ang-II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina 1 (ECA) y bloqueantes de canales de Ca^{2+} . Si bien todos cuentan con buena eficacia, la adherencia de los pacientes al tratamiento no suele ser óptima, siendo la habitualmente reportada al año de iniciado el tratamiento menor al 50%. Además, la proporción de pacientes bajo tratamiento farmacológico que tiene un adecuado control de sus cifras de presión arterial históricamente varía entre el 20 al 50%, lo que hace imprescindible redoblar los esfuerzos en busca de estrategias terapéuticas más eficientes y un mejor control de los valores de presión arterial ¹³.

Por otro lado, dentro del frente comportamental se encuentran recomendaciones de modificaciones en los hábitos alimentarios, disminución del consumo de alcohol y del tabaquismo, así como la realización de ejercicio físico. Este último se desarrollará más adelante en detalle por ser el principal foco de este trabajo de tesis doctoral. Estas estrategias tienen como principal ventaja que no representan grandes cambios en la economía del paciente y que además sirven no sólo para mejorar la hipertensión, sino también otras patologías metabólicas. Sin embargo, dependen en gran medida de la adhesión del paciente al régimen y lamentablemente, como se mencionó anteriormente para las estrategias farmacológicas, los niveles de adhesión no suelen ser los suficientes. En un trabajo de metaanálisis publicado recientemente que incluye datos provenientes de 32 países y cerca de 3,3 millones de personas se demostró que solamente el 17,12 % de los participantes mayores de 18 años cumplían con la adherencia mínima aconsejada por la Organización Mundial de la Salud para ejercicio aeróbico o actividades de fortalecimiento muscular, la cual es de al menos 150 min semanales de ejercicio de intensidad moderada ¹⁴.

1.4 Hipertensión como inductor de hipertrofia cardíaca

Ante una sobrecarga de presión o volumen mantenida en el tiempo el corazón empieza a adaptarse –aumentando su masa, entre otras modificaciones- lo que le

permite una mejor respuesta a la sobrecarga de trabajo. El aumento en la masa del corazón por aumento en el tamaño de los cardiomiocitos y no de su número se conoce como hipertrofia y ocurre una vez el corazón ya terminó su desarrollo embrionario. Los cardiomiocitos adultos, que representan la mayor masa celular del corazón, tienen una muy baja o nula capacidad de dividirse^{15,16}, por lo que el aumento de la masa miocárdica ocurre fundamentalmente a expensas de un crecimiento de los cardiomiocitos viables, sin prácticamente modificar su número. Por ejemplo, esto se evidencia ante un infarto de miocardio, en el cual el número de cardiomiocitos isquémicos que muere se pierde definitivamente y son reemplazados no por nuevos cardiomiocitos sino por tejido fibrótico no contráctil.

En la hipertensión arterial ocurre una sobrecarga de presión por el aumento, entre otras cosas, de la resistencia periférica aumentando la poscarga, es decir, la tensión de la pared ventricular al inicio de la eyección de la sangre. El aumento en la resistencia al flujo de salida del ventrículo izquierdo genera que la presión ejercida por el ventrículo deba ser mayor para poder eyectar la sangre; y este estímulo junto a factores neuro-humorales aumentados en la patología son los responsables de que el corazón empiece a desarrollar un programa celular de aumento de tamaño de los cardiomiocitos.

Dependiendo del tipo de estímulo o del estado de desarrollo de la patología, el aumento en el tamaño de las células del corazón puede ser a predominio de uno de dos tipos: transversal o longitudinal; es decir que la deposición de nuevos sarcómeros se da en paralelo o en serie, respectivamente. Si la deposición ocurre en paralelo genera células más anchas, haciendo que el espesor de la pared ventricular aumente y el tamaño de la cámara disminuya. Este tipo de hipertrofia es característico de la hipertensión y de la falla cardíaca con fracción de eyección preservada (HFpEF)¹⁷. Tiene como consecuencia, siguiendo lo enunciado en la Ley de Laplace ([Figura 1](#)), una disminución de la tensión parietal, lo que es en principio beneficioso para el corazón porque evita un aumento mayor en la demanda miocárdica de O₂ por la sobrecarga de trabajo. En cambio, si el crecimiento se produce longitudinalmente da por consecuencia células más alargadas, las cámaras

cardíacas aumentan su tamaño y el espesor de la pared puede disminuir, aumentando la tensión parietal, lo que se traduce en una mayor demanda de O₂ por el miocardio, que termina generando problemas contráctiles. Este tipo de remodelado es característico de la cardiopatía dilatada o falla cardíaca con función de eyección reducida (HFrEF) ¹⁷.

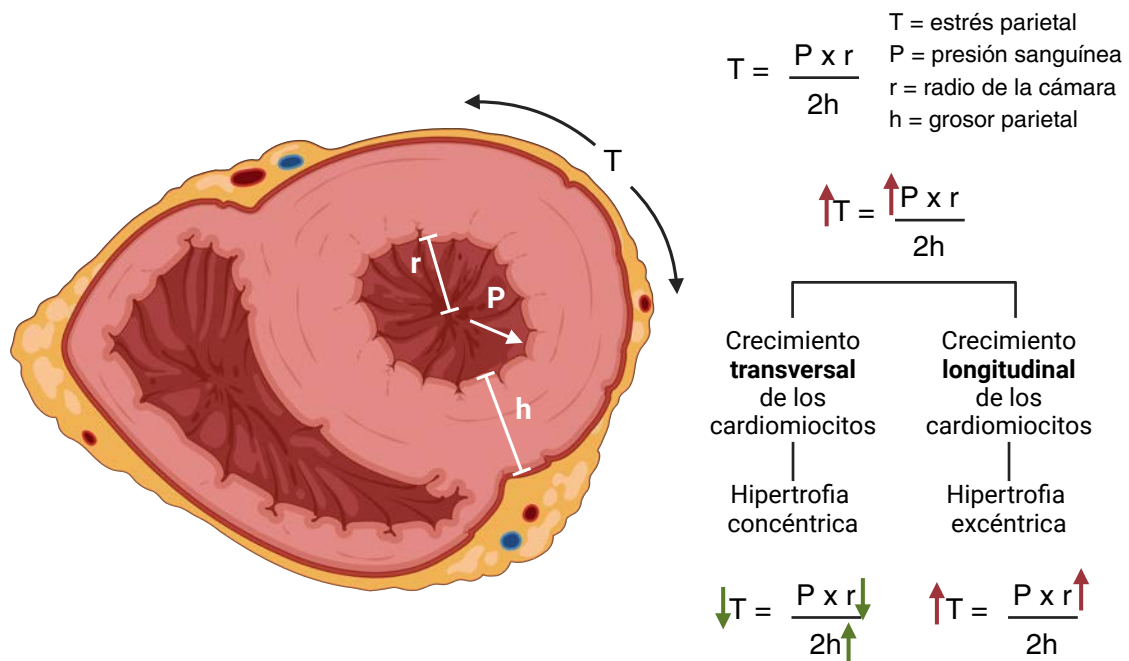


Figura 1. Ley de Laplace. Respuesta del miocardio ante la sobrecarga hemodinámica.

El aumento en el tamaño de las células está determinado por diversas vías de señalización intracelular activadas por estímulos mecánicos -estiramiento del miocardio ventricular por aumento de la presión-, por aumento de las catecolaminas circulantes y/o por hormonas tales como la Ang-II y ET-1, aumentadas en la hipertensión. Principalmente durante la hipertrofia se activan diversas vías intracelulares que convergen modificando los niveles intracelulares de Ca²⁺ y aumentando el contenido de proteínas contráctiles, la reactivación del programa fetal de genes -que incluye proteínas menos eficientes para el uso de ATP y la generación de fuerza-, la O-gluco-N-acetilación (O-GlcNAc) de proteínas y el estrés oxidativo ¹⁸.

Brevemente, el estiramiento del sarcolema genera la activación, entre otros, de los canales de potencial de receptor transitorio (TRPCs) que producen un aumento

del Ca^{2+} intracelular por el influjo de este ion a favor de su gradiente electroquímico ^{19,20}. Por otro lado, también estimula el aumento de Ang-II y ET-1 que conlleva a la activación de sus receptores acoplados a proteínas Gq, con el consecuente aumento de la actividad de fosfolipasa C (PLC) e inositol trifosfato (IP_3), lo que, a través de varios pasos, también contribuye al aumento del Ca^{2+} intracelular ²¹. Además, el aumento de las catecolaminas circulantes a través de vías de señalización intracelulares mediadas por receptores β 1-adrenérgicos asociadas a proteínas Gs, promueven el aumento de cAMP y consecuentemente la activación de la proteinquinasa A (PKA), la cual fosforila a diversos blancos intracelulares que también conllevan al aumento del Ca^{2+} en el citosol, además de la activación de factores de transcripción independientes del aumento del este ion.

Trabajos de nuestro centro de investigaciones demostraron que tanto la Ang-II como la ET-1 producen la hiperactivación de la isoforma cardíaca del intercambiador Na^+/H^+ (NHE-1) mediado por la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS) inducida por ROS que activa quinasas redox sensibles que terminan produciendo la fosforilación del intercambiador ([Figura 2](#)) ²¹⁻²⁷. Este aumento de actividad del NHE-1 produce un aumento del Na^+ citosólico, que promueve la actividad reversa del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal (NCX_{rev}), conduciendo al aumento de Ca^{2+} intracelular. La unión de este ion a la calmodulina favorece, entre otros procesos, la activación de la Ca^{2+} -calmodulina quinasa II (CaMKII). Esta quinasa fosforila a diversos blancos entre los cuales están los canales de Ca^{2+} del sarcolema y receptores de rianodina tipo 2 (RyR2) del retículo sarcoplásmico, que fosforilados promueven el aumento de Ca^{2+} en el citosol ²⁸. Todos estos aumentos en el Ca^{2+} intracelular, en un primer momento, producen un aumento en la fuerza contráctil del corazón útil para hacer frente a la sobrecarga de trabajo; pero al mantenerse aumentado produce la activación constante de vías de señalización, especialmente la de la fosfatasa calcineurina, que estimula la traslocación al núcleo de NFAT, quien promueve la transcripción de genes pro-hipertróficos y del programa fetal de contracción, que es menos eficiente a la hora de producir fuerza.

El NHE-1 está vinculado, además de a la regulación del pH intracelular, al manejo de Na^+ junto a la familia de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Existen dos isoformas en cardiomiocitos: la electroneutra (NBCn1) que intercambia un Na^+ por un HCO_3^- y la electrogénica (NBCe1) que intercambia un Na^+ por dos HCO_3^- ^{29,30}. Estos intercambiadores han sido vinculados con el desarrollo de hipertrofia al poder sobrecargar la célula de Na^+ y poder activar al NCX_{rev} .

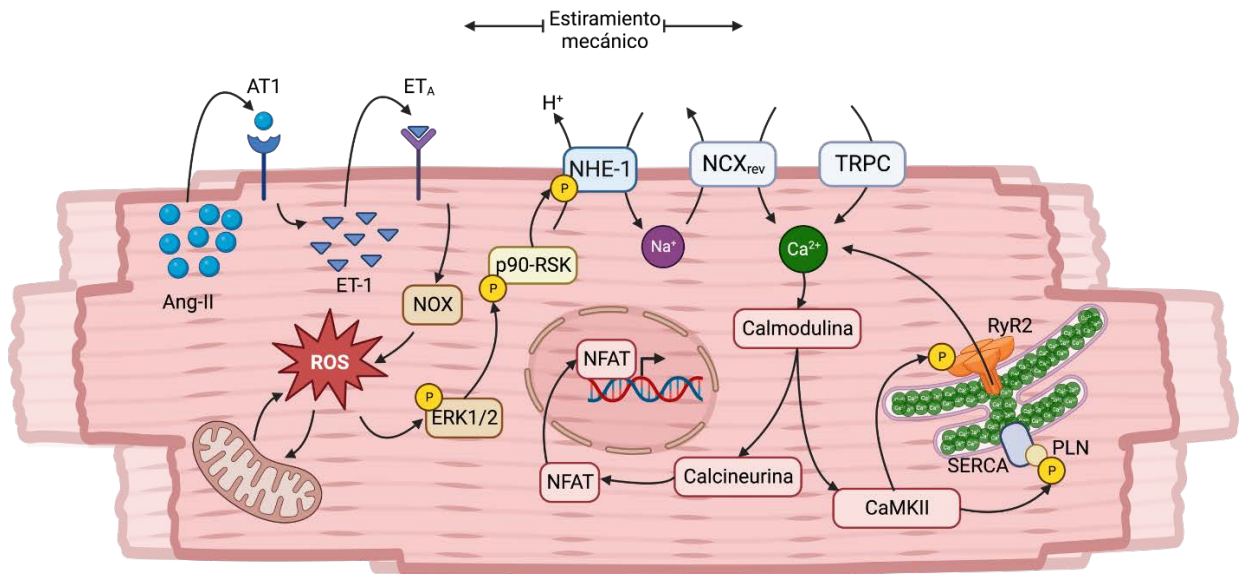


Figura 2. Vía de señalización estimulada por el estiramiento mecánico en cardiomiocitos.

A pesar de que este fenotipo hipertrófico al principio puede resultar beneficioso para el corazón, ya que reduce el estrés de la pared a la vez que gana fuerza contráctil, es perjudicial a largo plazo por, al menos, dos razones principales. La primera es que el aumento de la masa miocárdica sin un aumento equivalente de la microvascularización hace que la distancia de difusión para el O_2 y otros nutrientes aumente, por lo tanto, disminuyendo la disponibilidad de estos sustratos para la respiración celular ¹⁸. La segunda razón es que el aumento de la demanda de trabajo para el corazón genera en las mitocondrias miocárdicas un aumento en la producción de ATP, pero también en la de ROS. Estas últimas son las responsables, al menos en parte, de la activación de metaloproteasas y de estimular la proliferación de fibroblastos que son eventos críticos para el remodelado extracelular patológico,

promoviendo la fibrosis del tejido ³¹. De esta forma, el corazón desarrolla un programa de crecimiento hipertrófico que conlleva una adaptación en un primer momento potencialmente beneficiosa, pero que a largo plazo termina generando un miocardio menos irrigado, más rígido, con mayor estrés oxidativo y componente pro-inflamatorio.

1.5 Actividad física, ejercicio y entrenamiento

Es ampliamente conocido que realizar actividad física promueve la salud no solo a nivel cardiovascular ³²⁻³⁴, sino de todo el organismo ³⁵⁻³⁷; por lo que la Organización Mundial de la Salud recomienda para todos los individuos la realización de actividad física aeróbica moderada de entre 150 y 300 minutos semanales, o bien actividad física aeróbica intensa entre 75 y 150 minutos por semana ³⁸. La actividad física se define como cualquier movimiento que involucre los músculos esqueléticos y conlleve un gasto energético, como por ejemplo subir las escaleras o caminar. Por otro lado, ejercicio es el conjunto sistematizado de actividades físicas, como pueden ser nadar, correr, etc. Sin embargo, el término entrenamiento va más allá, ya que se refiere a la realización planificada y regular de ejercicio con un objetivo específico. Esta modalidad de ejercicio estructurado persigue modificaciones más sostenidas en el organismo, tales como la preparación para una competencia, la reducción del peso corporal o la estimulación del crecimiento/hipertrofia muscular.

La realización de ejercicio regularmente reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de eventos cardíacos tanto en hombres como en mujeres, sin importar su edad. Además, mejora la supervivencia de personas activas físicamente luego de un evento cardiovascular ³⁹. Sin embargo, hay evidencia de que el ejercicio excesivo puede generar daño al corazón ⁴⁰. En línea con esto, se ha propuesto la hipótesis del “ejercicio extremo”, la cual está caracterizada por una curva dosis-respuesta en forma de U o J invertida entre la cantidad de ejercicio y los resultados en la salud cardiovascular ([Figura 3](#)) ⁴¹. Brevemente, en esta hipótesis se plantea que la realización de poco ejercicio no tiene efectos a nivel cardiovascular, la realización

de una gran cantidad tiene efectos beneficiosos y que el exceso aumenta el riesgo cardiovascular. Sin embargo, esto depende del tipo de ejercicio y las características morfométricas y genéticas del individuo. Independientemente de la intensidad de los ejercicios, excluyendo al ejercicio extremo, todos han demostrado algún grado de beneficio para el organismo ⁴²⁻⁴⁴. Las consecuencias beneficiosas inducidas por el ejercicio ocurren porque tiene no solo efectos en los distintos tipos de células del corazón, sino que también en otros sistemas, como el vascular, muscular, nervioso y tejido adiposo, los cuales, a su vez, pueden tener efectos indirectos sobre el corazón

39

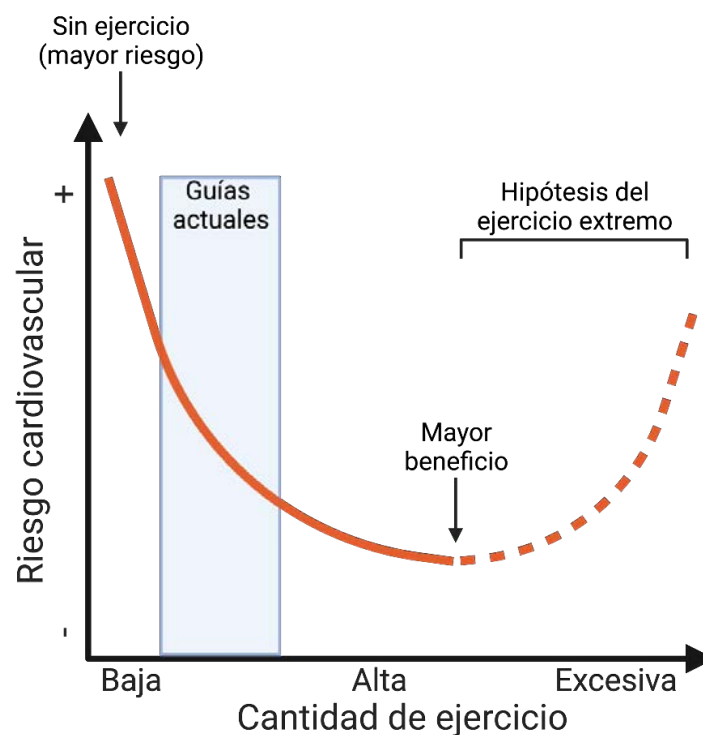


Figura 3. Hipótesis del ejercicio extremo. Adaptada y traducida de: *The "Extreme Exercise Hypothesis": Recent Findings and Cardiovascular Health Implications* ⁴¹.

1.6 Efectos agudos y crónicos del ejercicio en el sistema cardiovascular.

Durante el ejercicio existe un aumento de la demanda de O₂ principalmente por parte de los músculos en actividad, que promueve adaptaciones a nivel

cardiovascular tanto agudas como crónicas para poder cumplir con el suministro del O_2 necesario. En el ejercicio agudo, la primera activación se da por el aumento del tono simpático y disminución del parasimpático. Esto produce la liberación de adrenalina y noradrenalina que: 1) aumentan la frecuencia cardíaca por activación en el nodo sinoauricular de los receptores β acoplados a proteínas Gs que aumentan la disponibilidad de cAMP y consecuentemente la corriente despolarizante (I_F), aumentando la pendiente de la fase 4 del potencial de acción sinusal ([Figura 4A](#)); 2) tienen efectos inotrópicos (contractilidad) y lusitrópicos (relajación) positivos también producidos en parte por la misma vía de señalización intracelular, pero ahora en los cardiomiocitos, la cual promueve un mejor ciclado del Ca^{2+} ([Figura 4B](#)); 3) promueven la vasodilatación arteriolar tanto en músculos periféricos en actividad como en el miocardio, la vasoconstricción en la periferia manteniendo o incluso aumentando la presión arterial, lo que permite una redistribución y aumento del flujo sanguíneo hacia los tejidos con mayor actividad. Además, estos mecanismos conllevan a un aumento del retorno venoso que, a través del mecanismo de Frank-Starling ⁴⁵, contribuye aún más al aumento de la fuerza de contracción del miocardio, incrementando así el volumen sistólico. El aumento del volumen sistólico y de la frecuencia cardíaca se reflejan en un incremento del gasto cardíaco.

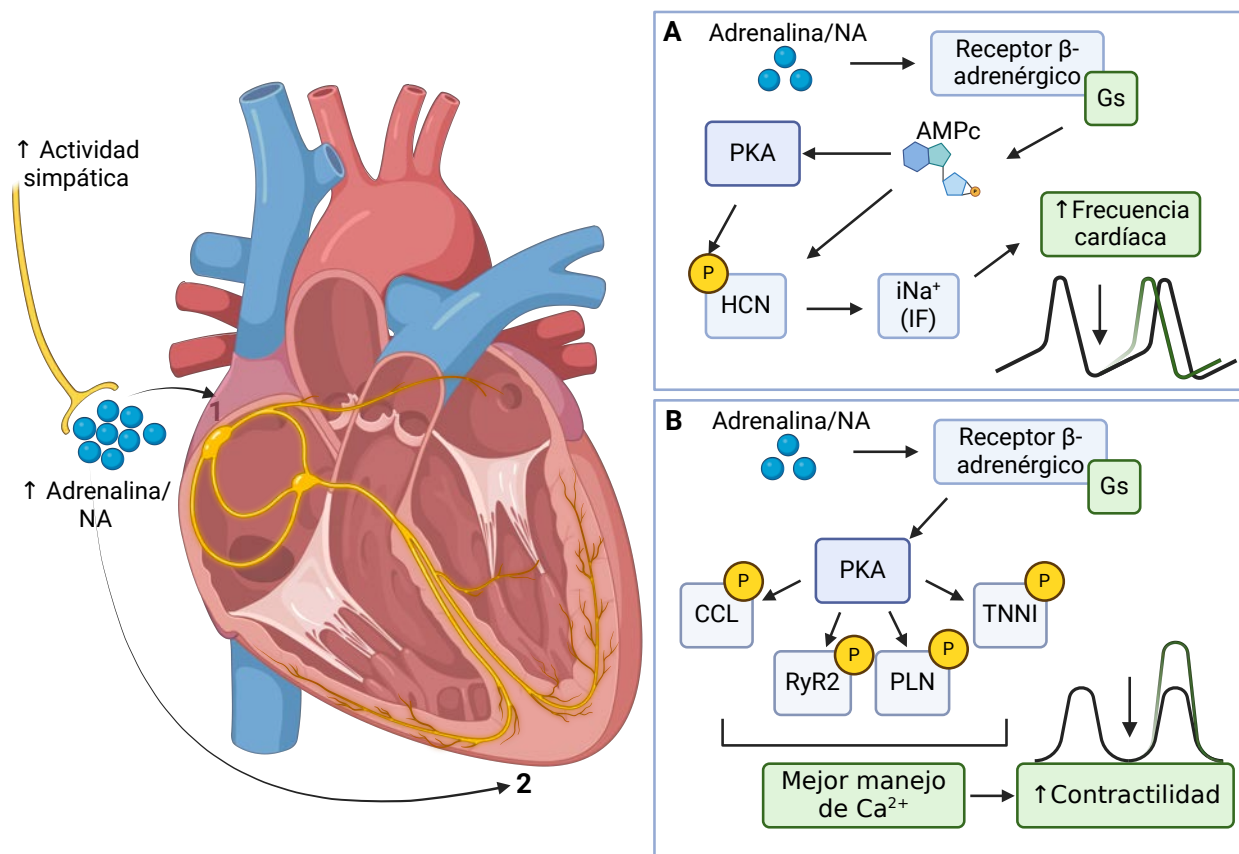


Figura 4. Efectos del sistema nervioso simpático sobre el corazón. A) Efecto sobre el nodo sinusal y la frecuencia cardíaca. B) Efecto sobre los cardiomiocitos y el inotropismo. NA: noradrenalina, PKA: proteína quinasa A, AMPc: adenosín monofosfato cíclico, HCN: canales dependientes de nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización: iNa⁺: corriente de Na⁺, IF: corriente funny, CCL: canal de Ca²⁺ tipo L, RyR2: receptor de rianodina tipo 2, PLN: fosfolamban, TNNI: troponina I.

En relación con las mitocondrias, además de su importancia en la energética celular también contribuyen a regular la concentración de Ca²⁺ en el citosol, como se detallará más adelante. La entrada de Ca²⁺ en la mitocondria se da en respuesta al gradiente de concentración para este ion. Durante la sístole hay un aumento del Ca²⁺ en el citosol, lo que estimula su entrada a la mitocondria a través del uniportador de Ca²⁺ mitocondrial (MCU); y la producción de ATP; este mecanismo permite satisfacer la demanda energética aumentada durante la contracción ^{46,47}. Esto se ve evidenciado, en un modelo de ratones mutantes para el MCU, los cuales presentan intolerancia al ejercicio agudo ⁴⁸. Así como la disminución de la expresión del MCU promueve la aparición de arritmias en modelos de síndrome de Barth ⁴⁹. Sin embargo, si la sobrecarga mitocondrial de Ca²⁺ es muy grande tiene efectos deletéreos sobre

su función; por lo que el mantener la homeostasis del Ca^{2+} en la mitocondria es crucial no solo para la producción de energía y la función de bomba cardíaca, sino también para evitar la activación de vías pro-apoptóticas ⁵⁰.

Por otro lado, en el ejercicio crónico además del aumento del tono simpático que promueve las adaptaciones enumeradas anteriormente, también se estimula la liberación de hormonas y de factores de crecimiento que promueven el remodelado cardíaco mediante el engrosamiento de la pared y el aumento proporcional del tamaño de la cámara ventricular, reduciendo el estrés de la pared que resultaría del aumento de la carga hemodinámica (Ley de Laplace, [Figura 1](#)). Es decir, promueven una hipertrofia cardíaca, pero en este caso fisiológica. Cabe recalcar que, si bien el ejercicio promueve el remodelado de los cardiomiocitos, estas no son las únicas células afectadas, también lo hacen las otras poblaciones celulares que coexisten en el miocardio como fibroblastos, células endoteliales, células inmunes, entre otras. Dependiendo de la región del órgano adulto los porcentajes de estas poblaciones pueden verse modificados ⁵¹. Por ejemplo, en las aurículas los cardiomiocitos representan aproximadamente un 30% del número de células, los fibroblastos 24%, las células inmunes 10% y el porcentaje restante corresponde a las células endoteliales; mientras que en ventrículos los cardiomiocitos representan cerca del 50%, los fibroblastos 15%, células inmunes 5% y el resto corresponde a células endoteliales. Además, estos valores también pueden verse modificados si existe alguna patología, por ejemplo, en el infarto agudo de miocardio existe una mayor infiltración de fibroblastos y de células inmunes por el estado proinflamatorio del tejido ^{52,53}. A pesar de que los cardiomiocitos representan algo menos del 40% de la población celular global del corazón, constituyen cerca del 70-80% de la masa cardíaca ^{54,55}, esto hace que sean las principales células responsables del remodelado hipertrófico.

1.7 Hipertrofia cardíaca fisiológica

El entrenamiento -ejercicio crónico- induce adaptaciones a nivel cardíaco que terminan promoviendo hipertrofia, pero muy diferente funcional, histológica y molecularmente a la hipertrofia patológica que fue antes mencionada ⁵⁶. Como se mencionó anteriormente, por la baja tasa de proliferación de los cardiomiocitos, el crecimiento en la masa cardíaca también se da principalmente por el aumento del tamaño de los cardiomiocitos ya existentes y no por nuevos ^{15,16}. No obstante, existen trabajos, si bien son controvertidos, que postulan que el entrenamiento de ratones puede aumentar la proliferación y renovación celular hasta un 7%, probablemente partiendo de células madre cardíacas o de cardiomiocitos preexistentes ⁵⁷⁻⁵⁹. Sin embargo, la hipertrofia cardíaca fisiológica estimulada por el entrenamiento es independiente de la existencia de proliferación celular ⁶⁰.

En este tipo de hipertrofia, el corazón se remodela sinérgicamente por un crecimiento de los cardiomiocitos que está acompañado de una batería de modificaciones que van en el mismo sentido ^{56,61}. El crecimiento de los cardiomiocitos en la hipertrofia fisiológica, a diferencia de lo que ocurre en las patologías cardiovasculares prohipertroóficas, es proporcional, es decir la deposición de sarcómeros es tanto en serie como en paralelo ¹⁷. Esto genera que, si bien hay un aumento del tamaño de las cámaras, también hay un aumento del ancho de la pared ventricular, por lo que tensión parietal puede mantenerse constante o incluso disminuir ([Figura 1](#)). Dentro de las modificaciones inducidas por la hipertrofia fisiológica existen efectos a nivel vascular, del acoplamiento excito-contráctil, mitocondrial y de vías de respuestas de estrés celular ³⁹. Es decir que hay un crecimiento coordinado de la masa miocárdica, y, por ende, un crecimiento de la capacidad de generar fuerza, del suministro de nutrientes y de la viabilidad celular.

Respecto a los efectos a nivel vascular, durante el ejercicio, los cardiomiocitos secretan el factor de crecimiento de endotelio vascular (VGEF) que tiene estimula la angiogénesis ^{62,63}. En la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por el ejercicio hay estudios que demuestran que hay aumento de la angiogénesis de forma análoga con el agrandamiento cardíaco ^{64,65}. Además, el aumento en la carga hemodinámica,

producto de la activación simpática, promueve la liberación de NO por parte del endotelio ⁶⁶. En estados fisiológicos y durante el ejercicio, el NO producido es el resultado, principalmente, de la actividad de las isoformas endotelial y neuronal de la óxido nítrico sintasa (eNOS y nNOS, respectivamente), mientras que en patologías cardíacas está descrito que la isoforma inducible (iNOS) toma relevancia ⁶⁷. El NO producido por el endotelio actúa como vasodilatador al difundir y promover la relajación de las células musculares lisas de la vasculatura mediante la vía canónica de NO/cGMP. Además, el NO puede funcionar como una molécula antioxidante al consumir aniones superóxido (O_2^-) que inhibe el aumento de producción de ROS, mediante su consumo para producir peroxinitrito ($ONOO^-$). Sin embargo, ante un aumento excesivo de ROS, las NOS se pueden desacoplar y la formación de $ONOO^-$ termina produciendo la nitración de las proteínas y de más O_2^- ⁶⁸. El ejercicio produce un aumento de metabolitos derivados del NO, nitritos y nitrosotioles, que funcionan como reservorio antioxidante protegiendo al corazón de ROS, de la fibrosis e hipertrofia cardíaca patológica ^{69,70}.

Por otro lado, además de los efectos producidos por la vía β -adrenérgica/PKA mencionados antes, existen trabajos que postulan una activación de CaMKII inducida por el entrenamiento aeróbico que profundizaría los efectos de la PKA; sin embargo, la activación excesiva de la CaMKII está ampliamente asociada con la hipertrofia cardíaca patológica, falla cardíaca y arritmias ⁷¹⁻⁷³. Por lo que resulta controversial el grado de su activación durante el ejercicio y más investigaciones son necesarias para dilucidar el mecanismo preciso de esta quinasa y sus efectos sobre el corazón.

Las modificaciones en la maquinaria contráctil y en las mitocondrias hasta ahora mencionadas -mejor ciclado de Ca^{2+} - ocurren en agudo; pero, como el entrenamiento promueve la hipertrofia del corazón, también tienen lugar modificaciones crónicas en estos aspectos. Dentro de estas modificaciones podemos mencionar la mayor expresión de canales iónicos en el sarcolema acompañando el aumento del tamaño de los cardiomiocitos ⁷⁴. En modelos de hipertrofia cardíaca por sobrecarga de presión y miocardiopatía dilatada que son sometidos a entrenamiento está descrito

que se evita la prolongación del intervalo QT en el ECG, característico en estas patologías ⁷⁵.

Puntualmente en relación con las adaptaciones mitocondriales inducidas por el entrenamiento, hay poca bibliografía respecto a aquellas a largo plazo. En un modelo murino de constricción de la aorta transversa sometido a una rutina de ejercicio en cinta durante 8 semanas se encontró que la autofagia, la fisión y la fusión mitocondrial previamente aumentadas, se reducían como consecuencia del ejercicio, lo que los autores vincularon con un programa de restauración mitocondrial ⁷⁶. En el modelo murino de hipertensión arterial esencial, SHR, se demostró por estereología que el ejercicio en cinta modifica la cantidad de mitocondrias miocárdicas, pero no se indagó en los mecanismos moleculares subyacentes ⁷⁷. Sin embargo, en modelos experimentales de animales normotensos, el ejercicio produjo un aumento o no generó ningún cambio en la cantidad de mitocondrias presentes en el miocardio ^{78,79}. Es evidente que los mecanismos puestos en juego para las adaptaciones cardíacas dependen del modelo utilizado y que estos aún no se conocen con claridad. No obstante, se postula que modificaciones en la dinámica mitocondrial podrían contribuir a la mejora del fenotipo inducida por el entrenamiento. Lo expuesto deja en evidencia la necesidad de generar nuevo conocimiento acerca de esto.

1.8 Reversión no farmacológica del remodelado patológico

Los tipos de hipertrofia cardíaca fisiológica y patológica presentan diferencias a nivel molecular, celular y tisular, como ya ha sido desarrollado anteriormente. La hipertrofia cardíaca patológica, por el estrés celular que puede llevar a la muerte de los cardiomiocitos y la deposición de colágeno, tradicionalmente se considera como irreversible. En cambio, la hipertrofia cardíaca fisiológica, que involucra un crecimiento integral de los distintos componentes del miocardio en respuesta a la sobrecarga de trabajo, es reversible. Esto último quiere decir que, si el estímulo deja de estar presente, la hipertrofia regresa y el corazón recupera su masa normal.

En relación con esto, resultados previos de nuestro laboratorio y de otros investigadores⁸⁰⁻⁸⁴ demostraron que puede haber una interconversión entre los tipos de hipertrofia con efectos cardioprotectores. Nuestro grupo demostró que una rutina de natación de 8 semanas de duración en ratas SHR es capaz de generar un remodelado cardíaco reverso, es decir, convertir la hipertrofia patológica en un fenotipo más fisiológico⁶⁵; y que la hiperactividad del NHE-1 actúa como mecanismo crítico de apagado o encendido del programa hipertrófico que conduce al desarrollo de la hipertrofia fisiológica o patológica, respectivamente^{61,85}. Particularmente, en este remodelado cardíaco reverso hemos demostrado que el entrenamiento de natación es capaz de aumentar la función de bomba cardíaca y reducir los niveles de los marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca patológica ANP y β -MHC⁶⁵. Además, es capaz de aumentar la densidad capilar y disminuir los niveles de fibrosis y apoptosis en el miocardio de las ratas SHR.

1.9 Balance redox en el miocardio hipertrófico hipertensivo

Como se mencionó anteriormente, el aumento de la carga de trabajo inducida por la sobrecarga hemodinámica de presión hace que el estiramiento miocárdico y los diversos factores neurohumorales liberados conduzcan a un aumento de ROS que promueven un círculo vicioso de mayor producción de ROS, generando estrés oxidativo. Sin embargo, aún no está del todo esclarecido si el aumento de ROS es solo consecuencia de la sobrecarga de trabajo o también causa de la hipertrofia patológica⁸⁶. Especialmente en el modelo utilizado en esta tesis doctoral -SHR-, la hipertensión arterial produce un estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo generalizado en todo el organismo que contribuye a la producción de ROS y que puede sensibilizar a los tejidos al daño⁸⁷. El aumento en los niveles de ROS está asociado al remodelado patológico del corazón, fibrosis, peroxidación lipídica, mutaciones del ADN, disfunción contráctil y del manejo del Ca^{2+} y apoptosis⁸⁷.

Dentro de las principales fuentes de ROS en las células están las enzimas NOX y las mitocondrias. Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que las ratas SHR

presentan un aumento en el estrés oxidativo respecto a su control normotenso en edades avanzadas; sin embargo, en ratas adultas jóvenes esto no se evidencia, posiblemente debido a un aumento de la actividad de la enzima antioxidante catalasa⁸⁸. Además, existen diferencias en los niveles de estrés oxidativo en las ratas SHR dependiendo del sexo, los machos presentan un mayor estrés oxidativo que las hembras, mediado por un aumento en la expresión/actividad de NOX, una inadecuada actividad de superóxido dismutasas (SOD) y una disminución de BH₄, éste último asociado con una menor actividad de las NOS^{85,89-91}. El aumento de la producción de ROS en animales jóvenes no se traduce en pérdida de la función cardíaca puesto que está compensado por los mecanismos antioxidantes; pero, al avanzar la edad, si no existe alguna estrategia para garantizar un aumento en las defensas antioxidantes, empieza a ver una descompensación del balance redox que termina generando daño en el miocardio.

1.10 Mitocondrias miocárdicas

Las células eucariotas tienen dos fuentes principales de energía: las rutas catabólicas citosólicas - glucólisis y fermentación, entre otras- y el metabolismo oxidativo a nivel mitocondrial. Estas organelas, con su origen endosimbiótico, han evolucionado hasta convertirse en el sitio especializado para la producción de ATP. Las mitocondrias, particularmente en las células musculares, tienen un rol preponderante al suplir al aparato contráctil con el ATP requerido. De esta forma, los miocitos -y en especial los cardiomiocitos- tienen un gran número de mitocondrias, llegando a ocupar casi el 30% del volumen celular⁷⁸.

Actualmente se conoce que las mitocondrias tienen roles muy importantes en otros procesos celulares además de la producción energética. Dentro de estos procesos se encuentran la señalización por ROS, la muerte celular y el manejo del Ca⁺². Estos mecanismos, así como la fosforilación oxidativa, se verán más en detalle en los siguientes apartados.

1.11 Fuerza protón motriz, pH y potencial de membrana mitocondrial

El corazón es un órgano con un alto consumo metabólico y la producción de energía depende principalmente de la β -oxidación de ácidos grasos y, en menor medida, también de la glucólisis y otras vías, como la fermentación láctica o la utilización de cuerpos cetónicos ⁹². Sin embargo, en diversas patologías cardiovasculares existe un cambio de preferencia de sustrato y el corazón pasa a utilizar la glucosa como fuente principal de energía ya que la incorporación y oxidación de ácidos grasos se ve perjudicada ⁹²⁻⁹⁴. Independientemente, de que la β -oxidación sea más eficiente para producir ATP que la glucólisis, ambas vías convergen en la mitocondria y en el Acetil-CoA, una molécula utilizada por el ciclo de Krebs para formar NADH y FADH₂ ([Figura 5A](#)).

En la fosforilación oxidativa, los electrones provenientes de los intermediarios metabólicos NADH y FADH₂ son removidos gracias a los distintos potenciales de reducción de los diferentes complejos proteicos de la cadena transportadora de electrones (CTE) presentes en la membrana mitocondrial interna ([Figura 5C](#)). Brevemente, el NADH es oxidado por el complejo I (NADH deshidrogenasa) y, por su parte, el FADH₂ es oxidado por el complejo II (succinato deshidrogenasa). En ambos casos, los electrones obtenidos son cedidos primero a complejos Fe-S dentro de los complejos proteicos y luego a la coenzima Q (ubiquinona), que funge como punto de convergencia a partir del cual los electrones en la CTE son transportados por un único camino. La coenzima Q es una proteína que puede difundir libremente en la membrana y transporta los electrones hacia el complejo III (ubiquinol-citocromo C reductasa). Una vez en este complejo, el citocromo C (CytC) es reducido y luego se disocia, difundiendo por la membrana. El complejo IV (citocromo C oxidasa) al interactuar con el CytC lo oxida y transporta estos electrones al receptor final que es el O₂. Este transporte de los electrones conlleva la extrusión, en contra del gradiente, de H⁺ hacia el espacio intermembrana por los complejos I, III y IV y finaliza en la reducción del O₂ en H₂O ⁹⁵.

Según la teoría quimiosmótica propuesta por Peter Mitchell en 1961 ⁹⁶, esta extrusión de H⁺ genera una fuerza protón-motriz (FPM) que es la responsable de la

producción de ATP en la mitocondria por parte del complejo V (F_0F_1 -ATP sintasa). La FPM está determinada por dos variables: un gradiente químico (ΔpH) y un gradiente eléctrico ($\Delta \Psi_m$) de H^+ , a través de la membrana mitocondrial interna. A 37 °C y utilizando la ecuación simplificada de Nernst se puede definir a la FPM con la siguiente ecuación ⁹⁷:

$$FPM (mV) = \Delta \Psi_m - 60\Delta pH$$

Fisiológicamente, el valor de $\Delta \Psi_m$ se estima alrededor de -150/-180 mV y el de ΔpH de 0.5/1, esto quiere decir que la matriz mitocondrial es más negativa y alcalina que el espacio intermembrana ^{98,99}. De ambos términos, el primero tiene más importancia ya que la energía potencial producto del $\Delta \Psi_m$ es de mayor magnitud. Así, se estima que fisiológicamente la FPM es cerca de -180/-220 mV y su mantenimiento en ese orden es crucial para la función mitocondrial ⁹⁷.

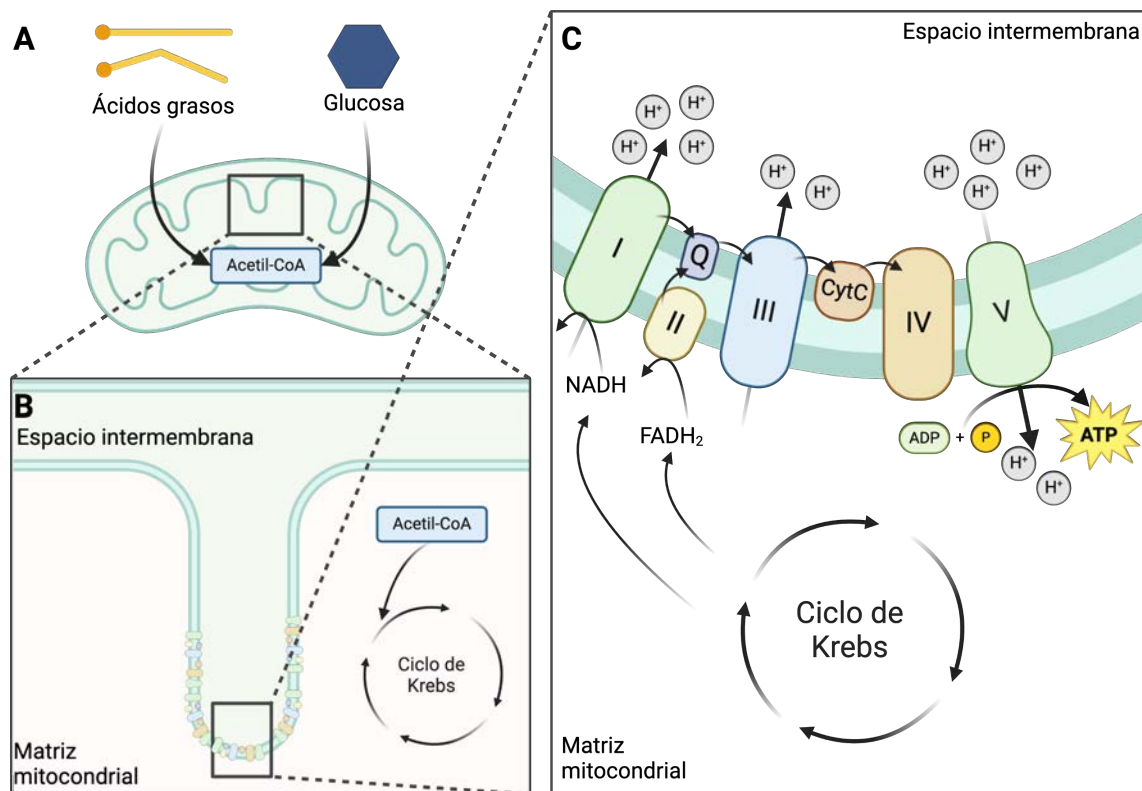


Figura 5. Esquema mitocondrial. A) Estructura mitocondrial y principales fuentes de energía. B) Estructura de crestas mitocondriales y la utilización de Acetil-CoA por el Ciclo de Krebs. C) Composición de la cadena de transporte de electrones. I: NADH deshidrogenasa, II: succinato deshidrogenasa, III: ubiquinol-citocromo C reductasa, IV: citocromo C oxidasa, V: F_0F_1 -ATP sintasa, Q: coenzima Q, CytC: citocromo C.

1.12 Dinámica mitocondrial

La mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en el ADN nuclear y mutaciones en estos genes son causantes inequívocas de diversas patologías como los síndromes de Kearns–Sayre y de Leigh; y también han sido asociadas con las enfermedades de Parkinson y Alzheimer ¹⁰⁰. Además, en los últimos años se ha descrito que desórdenes en la estructura y el fenotipo mitocondrial son parte de los mecanismos de desarrollo de distintas patologías, como diversas enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer ¹⁰¹. El fenotipo de las mitocondrias presente en las células está determinado principalmente por la dinámica mitocondrial ([Figura 6](#)).

La dinámica mitocondrial hace referencia a la capacidad de la mitocondria para ser movilizad a lo largo del citoesqueleto, interactuar con otras estructuras subcelulares y dar forma a sus membranas interna y externa a través de eventos de fusión y fisión ¹⁰². Dentro de las interacciones con otras estructuras y que involucran tanto a la fusión como la fisión, se encuentran la biogénesis mitocondrial y la mitofagia, las cuales contribuyen al recambio mitocondrial. Estos procesos se detallarán con mayor profundidad en los siguientes apartados.

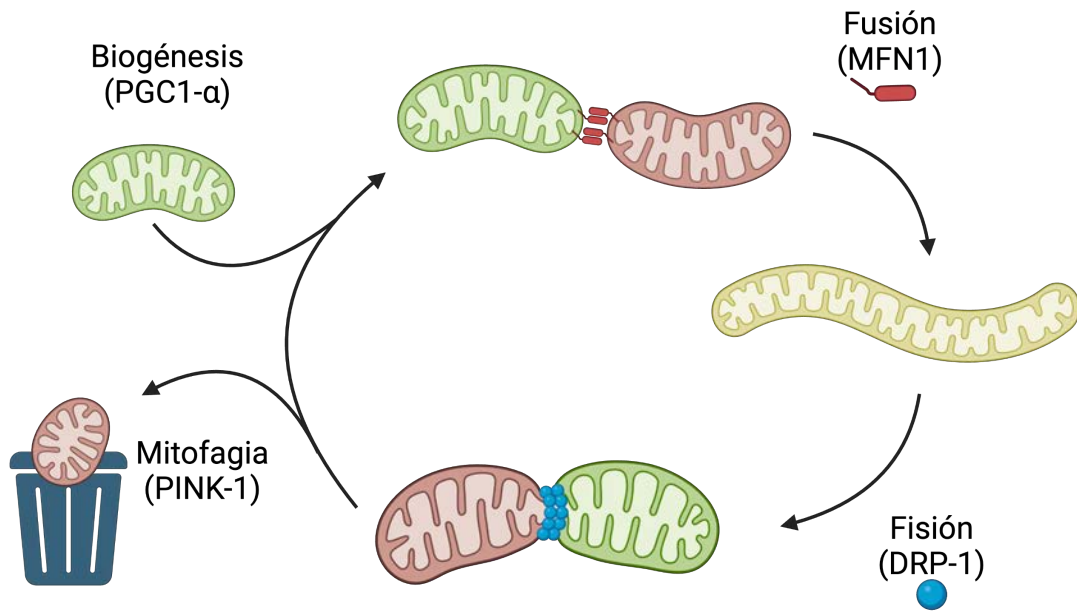


Figura 6. Esquema de los procesos vinculados a la dinámica mitocondria y algunos de sus marcadores. PGC1- α : coactivador 1- α del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas, MFN1: mitofusina1, PINK-1: quinasa 1 inducida por PTEN, DRP-1: proteína relacionada a la dinamina 1.

1.12.1 Fusión

La fusión mitocondrial consiste en la unión de las membranas de dos mitocondrias contiguas para formar una mitocondria más grande con el contenido de la matriz de las mitocondrias parentales unificado. Este proceso está regulado por diversas proteínas, siendo unas de las principales las GTPasas: mitofusina (Mfn), que presenta dos isoformas MNF1 y MFN2, y Opa1. Ambas isoformas de la Mfn están involucradas en la fusión; en el caso particular de la Mfn2 se ha descrito que también participa en las membranas del retículo asociadas a mitocondrias (MAMs) y juega un rol clave en la comunicación retículo endoplasmático/mitocondria y en la homeostasis del Ca^{+2} a nivel subcelular¹⁰³. La fusión mitocondrial se lleva a cabo en 4 pasos: 1) la adhesión de dos mitocondrias en trans, mecanismo regulado por MFN1/2; 2) el acoplamiento de las dos membranas aumentando la superficie de contacto; 3) la fusión de las dos membranas externas por cambios conformacionales

inducidos por la hidrólisis de GTP; y 4) la fusión de las membranas internas regulada por Opa1 ¹⁰⁴.

Este proceso permite diluir la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial y proteínas oxidadas -menos funcionales- en la matriz, así como tener una red mitocondrial más interconectada ¹⁰¹. Por ejemplo, el aumento en el estrés oxidativo y, por lo tanto, de la oxidación de MFN1/2 en sitios del espacio intermembrana promueve la fusión mitocondrial ¹⁰⁵. Además, el incremento en la fusión de la red mitocondrial se cree que funciona como un mecanismo temporal protector ante el estrés leve, aumentando parcialmente la producción de ATP, bloqueando la mitofagia y retrasando la muerte celular ¹⁰³. Por otro lado, el aumento en el clivaje de Opa1 hacia isoformas más cortas que disminuyen la tasa de fusión está aumentado en la disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, pero interesantemente, también ante el aumento de la fosforilación oxidativa ^{102,106}. Por ello se ha propuesto que el aumento de la fusión en un principio es beneficioso, pero si se produce una hiperfusión crónica provoca efectos negativos sobre la función mitocondrial, ya que el recambio mitocondrial no se puede llevar a cabo y los daños al ADN y/o proteínas mitocondriales no pueden ser eliminados ¹⁰⁷.

1.12.2 Fisión

La fisión mitocondrial es un proceso contrario al anterior, ya que su resultado final es la formación de dos mitocondrias hijas a partir de una parental que es estrangulada por una maquinaria proteica compleja. Estas mitocondrias hijas suelen estar caracterizadas por contar con diferentes valores de $\Delta\Psi_m$ y de daño al ADN mitocondrial, lo que permite que la fisión pueda clasificar las mitocondrias que serán destinadas para su eliminación por la mitofagia ¹⁰². Dentro de esta maquinaria proteica, se encuentra la proteína relacionada a la dinamina 1 (Drp1), una GTPasa citosólica que al ser activada se transloca a la membrana mitocondrial externa. Una vez allí, Drp1 forma multímeros que rodean a la mitocondria ayudada por proteínas como el factor de fisión mitocondrial (Mff) y la proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1) que se agregan en un microambiente delimitado por el retículo endoplasmático, y terminan formando un anillo de constricción ^{101,104}. Además, recientemente se ha

demostrado que la fisión no ocurre sin la polimerización de la actina, necesaria para ejercer tensión y contribuir a la constricción de la mitocondria ^{108,109}.

En cuanto a la importancia de Drp1 en la célula, la delección de Drp1 en estado embrionario es letal, mientras que cuando ocurre en el corazón adulto promueve cardiomiopatía dilatada ^{102,110}. Drp1 sufre diversas modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, O-GlcNAc, entre otras. Esta GTPasa tiene dos sitios de fosforilación principales. El primer sitio, la serina en posición 616 (S616), es promotor de la fisión mitocondrial y el segundo, la serina en posición 637 (S637), es inhibidor de la misma al disminuir su actividad y su traslocación a la mitocondria ^{111,112}. El sitio S616 es fosforilado por quinasas como MAPK/ERK1/2, Cdk1, PKA, CaMKII y AKT y desfosforilado por calcineurina ¹¹³⁻¹¹⁵. Mientras que el sitio S637 ha sido descrito que es fosforilado también por CaMKII, pero principalmente por AMPK ^{113,116}. Además, ha sido descrito un sitio de fosforilación diferente a los anteriores (S693) por GSK3- β que inhibe la actividad GTPasa y por lo tanto la fisión ¹¹⁷. Por otro lado, ha sido demostrado que la O-GlcNAc de Drp-1 aumenta su reclutamiento en la mitocondria y produce la caída del $\Delta\Psi_m$ ¹¹⁸. Es evidente que el estado de activación de Drp1 depende en gran medida de la integración de las vías intracelulares activadas y del estado metabólico y energético de las células en un momento dado.

1.12.3 Biogénesis

Es el proceso por el cual se generan nuevas mitocondrias, involucra la producción de novo de proteínas específicas codificadas tanto a nivel nuclear como mitocondrial, la importación de las proteínas nucleares a la organela y la replicación del ADN mitocondrial ¹¹⁹. Una vez las proteínas fueron importadas y el ADN mitocondrial replicado se procede a la fisión mitocondrial para producir una mitocondria nueva funcional ¹²⁰. La biogénesis mitocondrial involucra el acople de diversos procesos en distintos sitios de la célula, por lo que su regulación es muy importante para la producción energética. El principal regulador de este proceso es el coactivador 1- α del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1- α). Este factor de transcripción es estimulado en situaciones potencialmente perjudiciales para la célula, como puede ser la escasez de O₂ o de ATP -mediante la

vía de HIF-1 α o AMPK respectivamente- como un mecanismo de rescate celular para evitar, entre otros, la depleción energética y muerte celular ^{119,121}.

La activación de PGC1- α por modificaciones postraduccionales, como fosforilación o acetilación, o por aumento de su transcripción termina activando diversas vías de señalización intracelulares como las asociadas a los factores de respiración nuclear (NRF), vías catabólicas de producción de energía y la angiogénesis ¹²². Además, ha sido descrito que la expresión de PGC1- α regula el tipo de sustratos metabólicos utilizados en el corazón para la producción energética ¹²³. En el corazón fetal la principal fuente de energía es la glucosa, pero durante el desarrollo ocurre un cambio fisiológico hacia la utilización de ácidos grasos, lo que aporta un mejor rendimiento de ATP; el aumento en la expresión de PGC1- α ha sido postulado como el responsable del cambio de utilización de sustrato ^{124,125}. Por otro lado, la activación de este factor de transcripción ha sido demostrado que también estimula los mecanismos antioxidantes celulares, como SOD, catalasa y glutatión peroxidasa-1 ¹²⁶, lo que resalta su importancia en un tejido altamente oxidativo como es el corazón.

1.12.4 Mitofagia

Es un programa de control de calidad mitocondrial que forma parte de la autofagia celular ^{101,127}. Este proceso permite la marcación selectiva y degradación de las mitocondrias disfuncionales ¹¹⁹. La mitofagia tiene dos vías principales: la dependiente de ubiquitinación y la dependiente de receptores. En la primera, la despolarización mitocondrial sirve como señal para que se active este mecanismo en el cual juegan un rol esencial las proteínas quinasa 1 inducida por PTEN (PINK-1) y Parkin. PINK-1 es una serina/treonina quinasa cuya actividad y localización mitocondrial depende del $\Delta\Psi_m$. Parkin es una E3 ubiquitina ligasa presente en el citosol que se transloca a la mitocondria por la fosforilación de PINK1. Una vez en la organela, Parkin ubiquitina a sustratos proteicos de la membrana externa mitocondrial generando una amplificación de la señal ¹²⁸. La ubiquitinación de las proteínas termina reclutando a receptores LC3 del autofagosoma. En la segunda vía, diversos estresores como el estrés oxidativo o la caída del $\Delta\Psi_m$ estimulan

directamente la interacción de proteínas presentes en la mitocondria (por ejemplo, BNIP3) con el receptor LC3 del autofagosoma ¹²⁹. Una vez acoplada la mitocondria a los LC3, se promueve incorporación de las organelas en los autofagosomas y luego éstos se fusionan con los lisosomas para su posterior degradación. En los últimos años se ha descrito una vía independiente de LC3 mediada por Ulk1/Rab9 pero que tiene el mismo objetivo final que las ya mencionadas ¹³⁰. Como conclusión, la mitofagia sirve para eliminar mitocondrias disfuncionales y por lo tanto es un mecanismo cardioprotector, pero su estimulación sin la correcta contraposición de la biogénesis mitocondrial podría tener efectos deletéreos al disminuir la cantidad de mitocondrias presentes en la célula y, por lo tanto, comprometer la producción de ATP.

1.12.5 Dinámica mitocondrial en cardiomiocitos adultos

Cabe recordar, como se mencionó anteriormente, que la dinámica consiste en movilización de las mitocondrias a lo largo del citoesqueleto, la interacción con otras estructuras subcelulares y los eventos de fusión y fisión. En el caso de los cardiomiocitos adultos la movilización a lo largo del citoesqueleto no tiene tanta relevancia en comparación con los otros dos aspectos, ya que la ultraestructura celular rica en maquinaria sarcomérica hace que las mitocondrias involucradas en la contracción estén densamente empaquetadas, limitando en gran manera su movimiento ¹³¹. De esta forma se definen tres poblaciones mitocondriales en los cardiomiocitos: interfibrilares, subsarcolemales y perinucleares. Las mitocondrias interfibrilares están densamente empaquetadas entre la maquinaria contráctil y participan en el manejo de Ca^{2+} y la producción de energía para la contracción; mientras que las subsarcolemales son esenciales para la señalización celular y proveer la energía para los transportadores de membrana; por último, las perinucleares suministran la energía para la transcripción ¹¹⁰. Que las mitocondrias interfibrilares estén empaquetadas no quita la posibilidad de que éstas sufran procesos de fisión y fusión, como han sido evidenciados tanto en músculo esquelético como en cardiomiocitos mediante eventos de “*kissing*” entre mitocondrias vecinas, en los cuales se fusionan y se fisian de forma rápida

intercambiando contenido de la matriz mitocondrial ^{132,133}. Esto resalta la importancia de tratar la dinámica mitocondrial en cardiomiocitos adultos de forma diferente a las células en cultivo, donde el cambio morfológico y posicional es más relevante.

1.13 Mitocondrias y producción de ROS

En las mitocondrias la producción de ROS se da principalmente como consecuencia del metabolismo y la producción de ATP, por lo tanto, está muy relacionada a la demanda energética y a la disponibilidad de sustratos. Dentro de estas organelas existen diversas fuentes de ROS, como por ejemplo la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), las monoaminas oxidasas y la piruvato deshidrogenasa, entre otras, pero la fuente más relevante es la CTE ¹³⁴. El O_2^- es la principal especie generada en la mitocondria y se da por la fuga prematura de los electrones en los complejos I, II y III ¹³⁵.

El complejo I es capaz de producir O_2^- mediante el flujo retrógrado de electrones. Este flujo ocurre cuando los electrones son forzados de regreso al complejo I por aumento de coenzima Q reducida (QH_2) e/o incremento de FPM, consecuencia del flujo por los complejos III y IV, con baja producción de ATP ¹³⁶. El complejo II produce O_2^- cuando existe una gran cantidad de sustrato (succinato 100-500 μ M) y altos niveles de QH_2 . Por último, el complejo III, es el que tiene mayor capacidad de producción de O_2^- y se da por el ciclo Q. Brevemente, la oxidación de QH_2 se da en 2 etapas, ya que el citocromo C solo puede recibir un electrón. En estas etapas es cuando se puede formar una especie intermedia (semiquinona) capaz de producir O_2^- . En resumen, como se esquematiza en la [Figura 7](#), si la producción de ATP está disminuida, cualquiera sea la causa, la CTE se satura lo que hace que la FPM y los niveles de QH_2 sean altos y los diversos complejos aumenten la producción de O_2^- .

134-136

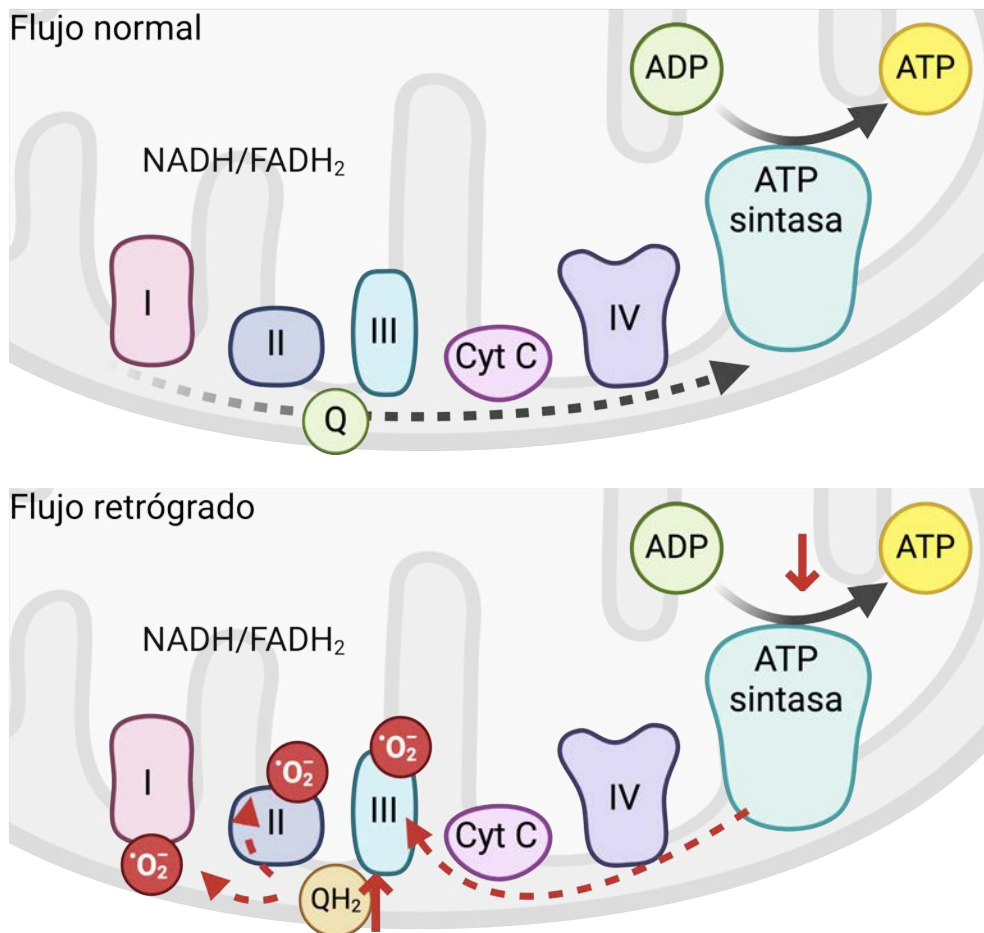


Figura 7. Esquema de la producción de $O_2^{\bullet-}$ en la cadena transportadora de electrones. Flujo normal con sustratos presentes y correcta producción de ATP y flujo retrógrado con acumulación de QH_2 y alta FPM con baja producción de ATP. I, II, III y IV: respectivos complejos de la cadena, Q: coenzima Q, QH_2 : coenzima Q reducida, CytC: citocromo C. Línea punteada negra: flujo normal de electrones, línea punteada roja: flujo retrógrado.

Debido a la gran producción de ROS, las mitocondrias cuentan con un grupo importante de sistemas antioxidantes entre los que se encuentran la Mn-SOD y la Cu/Zn-SOD, en la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana, respectivamente. Además, en la matriz mitocondrial -como en el citosol- se encuentran la catalasa y el sistema glutatión peroxidasa/reductasa ^{134,135}. Esto refuerza el concepto de que el correcto balance en la producción y la eliminación de las ROS es crucial para el funcionamiento de las mitocondrias y de la viabilidad celular.

1.14 Relación entre el Ca^{2+} y las mitocondrias

Las mitocondrias tienen diversos mecanismos para el manejo del Ca^{2+} que afectan la homeostasis de este ion tanto dentro como fuera de ellas ¹³⁷. Para el influjo de Ca^{2+} existe una vía principal y es a través del MCU junto con sus proteínas reguladoras. Mientras que para el eflujo existen tres vías: la preponderante, a través del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP) y las otras dos, por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NCLX) y el intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (CHE)

¹³⁸.

El mPTP es un canal de alta conductancia que permite transitoriamente la permeabilidad de la mitocondria, es decir permite el pasaje de iones y moléculas de hasta 1.5 kDa. La apertura del mPTP puede determinar el destino celular si es transitoria o sostenida y está estimulada por Ca^{2+} , P_i , ciclofilina D y estrés oxidativo ¹³⁹. La conformación exacta de las estructuras que forman el mPTP sigue siendo controversial, pero se sabe que proteínas como el canal voltaje dependiente de aniones (VDAC), Bcl-2 y el transportador de fosfato (PiC) regulan su apertura ^{140,141}. Además, está descrito que tanto el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) como dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa pueden fungir como canales con distintos tipos de conductancia, convirtiéndolos en candidatos para la estructura central del mPTP

¹³⁹.

El contenido de Ca^{2+} libre mitocondrial (CCM) guarda un equilibrio con el que está en forma de complejos con aniones fosfatos y proteínas. Aumentos en el CCM estimulan el metabolismo oxidativo al aumentar la actividad de las siguientes enzimas del ciclo de Krebs: piruvato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa; así como al transportador mitocondrial malato-aspartato y a la lanzadera de glicerol 3 fosfato ^{46,142}. Es decir que el aumento de Ca^{2+} activa la formación o ingreso de intermediarios metabólicos en la mitocondria que favorecen la producción de ATP. Por otro lado, el aumento excesivo del CCM puede generar la apertura prolongada del mPTP por la interacción del Ca^{2+} con la ciclofilina D ¹⁴³. Si bien existe una apertura fisiológica del mPTP que funciona como mecanismo de señalización del estrés oxidativo, el estado energético y la regulación metabólica, su

apertura sostenida provoca una caída del $\Delta\Psi_m$, aumento de ROS y por consiguiente la liberación del contenido de la matriz mitocondrial, dentro de la cual, además de distintos iones, se encuentra el CytC que activa vías pro-apoptóticas dependientes de caspasas ^{144,145}. Por lo tanto, la regulación de este ion en la matriz mitocondrial es de suma importancia para el metabolismo energético y el destino celular.

1.15 Rol de la cardiolipina y otros lípidos en la función mitocondrial

Las mitocondrias mantienen como reminiscencia de su origen endosimbiótico dos membranas, una interna y otra externa. Ambas con características y funciones diferentes entre sí y con las demás membranas celulares. Dentro de estas características se pueden enumerar las siguientes: 1) están formadas principalmente por fosfolípidos y no tienen cantidades significativas de esteroides y esfingolípidos, 2) su composición va a determinar en gran medida la dinámica mitocondrial, 3) presentan cardiolipina, un fosfolípido remanente del origen procariota, 4) la membrana interna tiene una gran cantidad de proteínas insertas y en ella pueden diferenciarse dos regiones diferentes -el límite interior y las crestas- ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

La composición lipídica total de las membranas mitocondriales está conformada de la siguiente manera: fosfatidilcolina (PC) 40-45%, fosfatidiletanolamina (PE) 25-30%, cardiolipina (CL) 10-15%, fosfatidilserina (PS) 3-5% y ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilglicerol (PG) el pequeño porcentaje restante. Sin embargo, las membranas externa e interna difieren en su composición ¹⁴⁷. La relación proteína/lípido en la membrana externa es muy baja, mientras que en la interna es muy alta, debido a que esta última contiene toda la maquinaria respiratoria y de producción de ATP. Ambas membranas tienen altos contenidos de lípidos no formadores de bicapas -PE y CL-, es decir, moléculas cónicas que tienen el grupo que forma la cabeza polar más chico que la voluminosa cola de ácidos grasos. La presencia de estos lípidos produce localmente curvaturas en la bicapa, así como sitios de desestabilización de la bicapa que permiten la inserción de proteínas ¹⁴⁹. La membrana interna, por su lado, está enriquecida en CL. Interesantemente, la mitocondria es capaz de sintetizar PE y CL,

mientras que el resto de los fosfolípidos son sintetizados en el retículo endoplasmático ¹⁴⁶.

Los lípidos mitocondriales -particularmente la CL- cumplen funciones importantes en la arquitectura de la membrana, como se mencionó anteriormente: la inserción de proteínas, el metabolismo respiratorio y la dinámica mitocondrial. Los complejos NADH-deshidrogenasa (I), citocromo c reductasa (III) y citocromo c oxidasa (IV) de la CTE suelen formar estructuras supramoleculares conocidos como supercomplejos, que resultan más eficientes en el manejo de substratos ¹⁵⁰. Mientras que el complejo succinato deshidrogenasa (II) no suele formar parte de estos supercomplejos. La actividad de los complejos de la CTE es estimulada tanto por PE como por CL ¹⁵¹. Además, ha sido descrito que la CL contribuye a estabilizar la estructura de los supercomplejos ^{152,153} y promueve el ingreso de ADP y egreso de ATP de la matriz a través del transportador de ADP/ATP ¹⁵⁴. Por lo tanto, la CL es un lípido estructural sumamente importante en la función y homeostasis mitocondrial y cambios en la cantidad o estructura de la CL pueden afectar la energética de la célula – y, por ende, en relación con esta tesis, afectar en gran medida a la función de bomba del corazón.

Con respecto a la dinámica mitocondrial, la presencia de los lípidos no formadores de bicapas permite el acceso a la membrana de proteínas vinculadas en estos procesos. La interacción de la proteína DRP1 con dominios ricos en CL promueven su autoensamblaje, su actividad GTPasa y la reorganización de este fosfolípido en la membrana, lo que facilita la constricción de las membranas que están preparadas para la fisión mitocondrial ¹⁵⁵. Por otro lado, el aumento de PA generado por el clivaje de la CL por la fosfolipasa D mitocondrial favorece la fusión mediada por MFN1/MFN2 ¹⁵⁶.

En cuanto a la ultraestructura mitocondrial, la CL tiene dos posibles mecanismos para promover la formación correcta de crestas. El primero, mediante la interacción con el sistema de organización de crestas y sitios de contacto mitocondriales (MICOS) estabilizándolo y permitiendo la formación de uniones de crestas ¹⁵⁷; y el segundo, mediante la formación de la curvatura del fondo de las crestas -al ser

fosfolípidos cónicos que no forman bicapas- que permite una correcta distribución de las F_1F_0 -ATP sintasas ^{158,159}.

Por último y vinculado con el estado redox, el estado de oxidación de las cadenas de ácidos grasos de los distintos fosfolípidos presentes en las membranas mitocondriales va a determinar, en primer lugar, su estructura y por consiguiente su interacción con proteínas u otros lípidos en la membrana¹⁶⁰. El estado de oxidación de los lípidos mitocondriales depende en gran medida del entorno, es decir de la producción de ROS en la mitocondria y de los mecanismos antioxidantes, como, por ejemplo, la actividad de la SOD2. Además, se ha demostrado in vitro que la presencia de Ca^{2+} también contribuye a la oxidación de las cadenas de ácidos grasos de la CL¹⁶¹. Incluso la composición de las cadenas laterales de la CL puede contribuir al estrés oxidativo por estimular la actividad peroxidasa del citocromo C¹⁶². Esto resalta el ciclo vicioso inducido por el aumento de ROS o de Ca^{2+} , generando daño a nivel lipídico y proteico que termina induciendo mayor producción de ROS y, por lo tanto, pudiendo desencadenar la muerte no solo de la mitocondria, sino de la célula.

1.16 IGF-1/IGF1R – vía cardioprotectora

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) es un péptido pequeño de 7.6 kDa cuya concentración plasmática, cardíaca y en músculo esquelético aumentan en respuesta al ejercicio físico tanto en modelos murinos como en atletas ^{163,164}. En humanos, se demostró una correlación positiva entre la síntesis de IGF-1 en el corazón de atletas y la masa ventricular izquierda ¹⁶⁵. La activación de la vía de señalización -IGF1R/PI3K/AKT- disparada por esta hormona es la predominante en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca fisiológica en respuesta al entrenamiento aeróbico ^{39,61,166,167}. Sin embargo, es importante recalcar que, tanto en la hipertrofia cardíaca fisiológica como en la patológica, los cambios morfológicos y funcionales cardíacos son la consecuencia de la activación de numerosas cascadas de señalización y no solamente de una vía puntual ¹⁶⁸.

El IGF-1 es capaz de regular la función contráctil del corazón teniendo un efecto inotrópico positivo, tanto en modelos animales como en miocardio humano ¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Dentro de los mecanismos por los cuales el IGF-1 es capaz de generar este efecto se ha propuesto: el aumento del Ca^{2+} citosólico mediado por canales e intercambiadores de membrana ¹⁶⁹ o el aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles¹⁷⁰. Sin embargo, no se conoce aún el mecanismo exacto, o si ambos forman parte de la respuesta integral.

Por otro lado, es bien conocido que la respuesta adaptativa del ejercicio regular involucra la activación de enzimas antioxidantes y disminuye el estrés oxidativo en enfermedades cardiovasculares, aunque hay pocas evidencias respecto a si estas acciones antioxidantes son a causa de la activación de la vía de IGF-1 o si hay otras vías involucradas ¹⁷².

Diversos estudios en modelos de entrenamiento y genéticos demostraron que la vía IGF-1/PI3K/AKT, además de promover la hipertrofia fisiológica, también es capaz de atenuar la hipertrofia patológica en modelos de enfermedad cardiovascular ¹⁷³⁻¹⁷⁸. Además, en plasma de pacientes con diabetes mellitus o en algunas enfermedades cardiovasculares, como hipertrofia del ventrículo izquierdo e infarto miocárdico, han sido reportados niveles bajos de IGF-1 ^{179,180}.

1.17 Apelina/APJ – vía cardioprotectora

La apelina es una hormona peptídica producida y secretada por diferentes tipos celulares, entre ellos los cardiomiocitos y las células endoteliales y musculares lisas de los vasos sanguíneos ¹⁸¹⁻¹⁸⁴. Es sintetizada como un pre-pro-péptido de 77 aminoácidos, que es clivado en péptidos de distinta longitud: apelina-13,-16,-17,-19 y 36. La apelina-13 es la isoforma predominante en el sistema cardiovascular y presenta la mayor actividad biológica y afinidad por su receptor ^{182,184,185}. Además, se han descrito mecanismos de señalización tanto de forma autocrina como paracrina dentro del miocardio ^{186,187}. Actualmente, la vía de señalización intracelular estimulada por apelina y su receptor específico APJ está siendo estudiada en gran medida por

su importancia en la regulación de la homeostasis cardiovascular. APJ es un receptor de 7 dominios transmembrana acoplado a proteína G, que forma parte de receptores huérfanos descubiertos a raíz de la decodificación del genoma humano ¹⁸⁸. La apelina, su ligando endógeno, es considerada una de las sustancias inotrópicas positivas más potentes descritas hasta la fecha y se le atribuye también un efecto antihipertensivo ^{182,189-191}.

En relación con el desarrollo de hipertrofia cardíaca y el balance redox, se demostró que la apelina previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca dependiente del aumento de ROS, a través del aumento de la expresión y actividad de catalasa ¹⁹². Sin embargo, resulta interesante que apelina promueve la hipertrofia de cardiomioblastos -H9c2- a través de la activación de la vía PI3K/AKT/ERK1/2 ¹⁹³. Además, también a través de la misma vía, podría producir protección miocárdica por la inhibición de la apertura del mPTP y la producción de ROS ¹⁹⁴. Por otro lado, resulta de relevancia el hecho de que los niveles de apelina y APJ están disminuidos en el miocardio hipertensivo de las SHR y que el entrenamiento aeróbico promueve un aumento de la expresión de estos ^{195,196}.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este proyecto fue estudiar, en un modelo murino de hipertrofia cardíaca patológica inducida por hipertensión arterial, el efecto del entrenamiento aeróbico sobre las alteraciones mitocondriales y el estrés oxidativo del tejido cardíaco, evaluando además si la apelina es un mediador de los efectos mitocondriales de IGF-1.

Para cumplir con los objetivos de este proyecto se propuso utilizar ratas SHR adultas siguiendo dos enfoques experimentales distintos: 1) Modelo in-vivo: ratas sometidas a una rutina diaria de natación durante 8 semanas y sus respectivos controles sedentarios; y 2) Modelo in-vitro: cardiomiocitos aislados expuestos a IGF-1 o apelina, con sus respectivos controles no expuestos a estos factores.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Determinar los efectos del entrenamiento físico sobre la función cardíaca.
- 2.2.2 Determinar en el miocardio hipertensivo el efecto del entrenamiento físico sobre:
 - 2.2.2.1 El estrés oxidativo: balance entre producción y eliminación de ROS.
 - 2.2.2.2 La función y ultraestructura mitocondrial.
 - 2.2.2.3 Los marcadores de los procesos involucrados en la dinámica mitocondrial.
 - 2.2.2.4 La expresión de IGF-1, apelina y sus receptores, así como la activación de las vías de las quinasas AMPK y AKT.

2.2.3 Investigar en un modelo in vitro de cardiomiocitos aislados de SHR el efecto agudo de IGF-1 como mediador de los efectos miocárdicos adaptativos del ejercicio sobre:

2.2.3.1 La función mitocondrial y el estrés oxidativo.

2.2.3.2 La acción de apelina como eslabón corriente abajo en la cascada de señalización disparada por IGF-1.

3. *Materiales y métodos*

3.1 *Protocolo de entrenamiento*

Consistió en 8 semanas de natación y representa un protocolo de entrenamiento aeróbico moderado, según lo descrito por Medeiros y colaboradores¹⁹⁷. Para llevar a cabo la rutina de natación, se adaptaron peceras de 100 x 50 x 60 cm a las cuales se las llenó todos los días con agua limpia a temperatura constante entre 30 y 32 °C.

SHR machos de 3 meses de edad fueron separados al azar en dos grupos experimentales: entrenados (E) y sedentarios (S). Los animales del grupo E cumplieron una rutina de natación constituida por 2 sesiones diarias de 45 min cada una durante 8 semanas ([Figura 8](#)). Durante la primera semana, tuvieron un periodo de adaptación que se realizó aumentando gradualmente el tiempo de ejercicio; el primer día se ejercitaron en 2 sesiones de 25 min cada una y luego se incrementó el tiempo en 5 min por día hasta llegar a 45 min/sesión. Este protocolo se mantuvo durante las 7 semanas restantes. Entre las sesiones diarias pasaron al menos 3 horas para el descanso de los animales. Por otro lado, el grupo S se sometió a la natación únicamente durante 10 min dos veces por semana, para simular el estrés hídrico al que fueron sometidas los animales del grupo E.

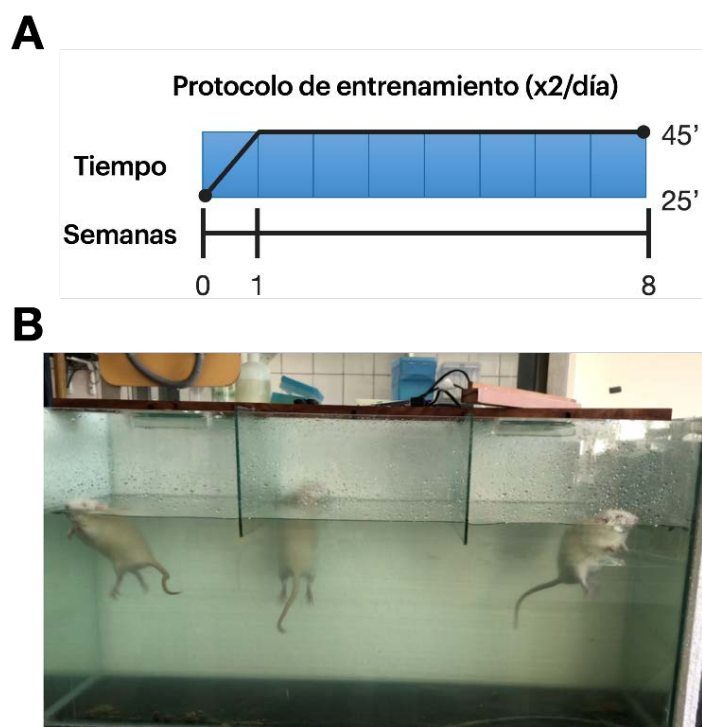


Figura 8. Protocolo de entrenamiento. A) Esquema de la rutina en rampa. B) Foto de los animales realizando el entrenamiento aeróbico.

3.2 Sacrificio de animales y toma de muestras

Al terminar las 8 semanas de entrenamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación. Rápidamente, se extrajo el corazón, músculo esquelético rojo (sóleo) y glándulas adrenales para los diversos experimentos y controles. Los corazones fueron lavados con buffer fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8 mM y KH_2PO_4 2 mM, pH 7.4) para eliminar la sangre residual y las glándulas adrenales se limpiaron de la grasa circundante antes de su pesaje. Todos los protocolos de manejo de animales empleados durante esta tesis fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (P04-04-2015).

3.3 Valores morfométricos del modelo

Para caracterizar al modelo se utilizaron los siguientes parámetros morfométricos: peso corporal de los animales, relación peso del corazón vs. peso corporal, relación peso del corazón vs. longitud de la tibia, relación peso de las glándulas adrenales vs. longitud de la tibia.

3.4 Toma de presión arterial

Se midió la presión arterial sistólica (PAS) por un método indirecto no invasivo¹⁹⁸. Brevemente, las ratas se colocaron en una cámara de acrílico a 37 °C por 10 min, para producir vasodilatación en la vasculatura de la cola, y luego se transfirieron a un inmovilizador de acrílico con una almohadilla calentadora donde se les colocó un brazalete en la cola acoplado a un sensor de presión (Narco Biosystems, Houston, TX). El brazalete de la cola estaba conectado a un sistema de aire comprimido que permite el inflado y desinflado del mismo a ritmo constante. La presión en la cola de los animales se midió de forma continua mediante un software (Labtech Notebook Pro, Laboratory Technology Corp., Wilmington, MA). Para cada medida de PAS se determinó el valor de presión al inflar y desinflar el manguito, así como el intervalo de compresión, según los descrito por Fritz y Rinaldi¹⁹⁹.

3.5 Ecocardiografía

Se realizaron ecocardiografías transtorácicas en los animales antes de iniciar y finalizar el protocolo de entrenamiento (día 0 y final de semana 8). Para ello se anestesiaron livianamente con 3% de isoflurano y 1% de mantenimiento con 21% de O₂ por vía inhalatoria y se les rasuró la zona torácica para la aplicación de gel ultrasónico. Utilizando un transductor lineal de 14-MHz (Toshiba Nemio XG, Japan) se obtuvieron imágenes bidimensionales del eje corto del ventrículo izquierdo. Luego de obtener las imágenes se realizaron mediciones en modo M con velocidad de

barrido de 50 mm/s según las guías de la Sociedad Americana de Ecocardiografía²⁰⁰. Las medidas se realizaron midiendo al menos tres ciclos cardíacos consecutivos por un operador, de forma ciega respecto a los grupos experimentales.

Se determinaron los siguientes parámetros según lo publicado por Boon J. en el manual de ecocardiografía veterinaria²⁰¹: diámetro diastólico y sistólico final del ventrículo izquierdo (DD y DS, respectivamente), espesor diastólico y sistólico del septum o tabique interventricular (SD y SS, respectivamente), espesor en diástole y en sístole de la pared posterior del ventrículo izquierdo (PPD y PPS, respectivamente), fracción de acortamiento endocárdica (Faen), el porcentaje de acortamiento medioventricular (%MV), promedio del ancho de la pared del ventrículo izquierdo (Pared), la masa ventricular izquierda (MVI), el índice de masa ventricular izquierda (IMVI) y el espesor parietal relativo al radio de la cavidad (h/r). Se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$Faen = 100 \times \frac{DD - DS}{DD}$$

$$\%MV = 100 \times \frac{(DD + \frac{SD + PPD}{2}) - (DS + \frac{SS + PPS}{2})}{(DD + \frac{SD + PPD}{2})}$$

$$Pared = \frac{SD + PPD}{2}$$

$$MVI = 1.04 \times [(DD + SD + PPD)^3 - DD^3]$$

$$IMVI = \frac{MVI}{\text{peso (g)}}$$

$$h/r = 2 \frac{PPD}{DD}$$

3.6 *Electrocardiograma*

Se realizaron electrocardiogramas de superficie a 40 kHz utilizando electrodos estándar (derivación I) y un software de adquisición de datos (Power Lab 4ST, Adinstruments, Nueva Zelanda). Para obtener el registro se utilizaron agujas de acupuntura que fungieron como electrodos, las cuales se insertaron superficialmente en la piel de los animales anestesiados con isoflurano 3%. Se verificó una frecuencia cardíaca constante y posteriormente se tomaron registros durante 2 min. Se promediaron aproximadamente 50 registros para las distintas variables cuantificadas. Para calcular los valores del intervalo QT corregido (QTc) se utilizó la fórmula de Mitchell:

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{\frac{RR}{100}}}$$

Donde QT es la duración promedio del intervalo desde el inicio del complejo QRS hasta el final de la onda T; y RR es la duración promedio entre dos ondas R consecutivas.

3.7 *Microscopía electrónica de transmisión*

Cortes de 1 mm³ de ventrículo izquierdo se fijaron con glutaraldehído 2 % durante 2 h a 4 °C. Después se lavaron con PBS y postfijaron con OsO₄ 1 % durante 2 h a 4 °C. Las muestras se lavaron nuevamente con PBS y se deshidrataron en una serie de soluciones de contenido de alcohol creciente (50 - 100%), y se terminó en acetona. Luego, las muestras se infiltraron e incluyeron en una resina epóxica por 36 h a 35, 45 y 60 °C para su polimerización. Se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 nm con un ultramicrotomo (Reichert-J Super Nova), los cuales fueron montados en una grilla de cobre y teñidos con acetato de uracilo y citrato de plomo 1%. Las muestras

fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 1200 – EX II) y las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital (Erlangshen ES 1000W).

Para la observación de mitocondrias aisladas, se obtuvo un pellet con un volumen de entre 1 y 2 mm³, partiendo de aproximadamente 50 µl de mitocondrias aisladas, que fue centrifugado a 1000 rpm por 3 min a 4 °C en glutaraldehído 2%, descartándose el sobrenadante. Luego, se lavó el pellet con PBS tres veces para eliminar el resto de fijador. El procesamiento posterior fue el mismo que para los ventrículos izquierdos, mencionado en el párrafo anterior.

3.8 Cuantificación de parámetros morfológicos mitocondriales

Las imágenes obtenidas de la microscopía electrónica de transmisión (MET) se analizaron y cuantificaron utilizando el software de código libre FIJI (Fiji Is Just ImageJ) ²⁰². Las imágenes fueron preprocesadas según lo publicado por Caffrey *et al* ²⁰³. Para el procesamiento de una gran cantidad de imágenes se desarrolló un macro ([Anexo A](#)) que permite el procesamiento de forma automática y sin necesidad de la intervención del usuario. Este macro toma una imagen de MET, le aplica un filtro de mediana con radio de 1, luego aplica una agrupación (*binning*) x, y de 2,2 utilizando la mediana como parámetro y, por último, se mejora el contraste con saturación 0.3, normalización y ecualización. El esquema del flujo de trabajo de este macro se puede observar en la [Figura 9](#). Estos pasos permiten que en las imágenes se pueda distinguir de mejor manera las estructuras, mejorando su contraste y reduciendo el ruido.

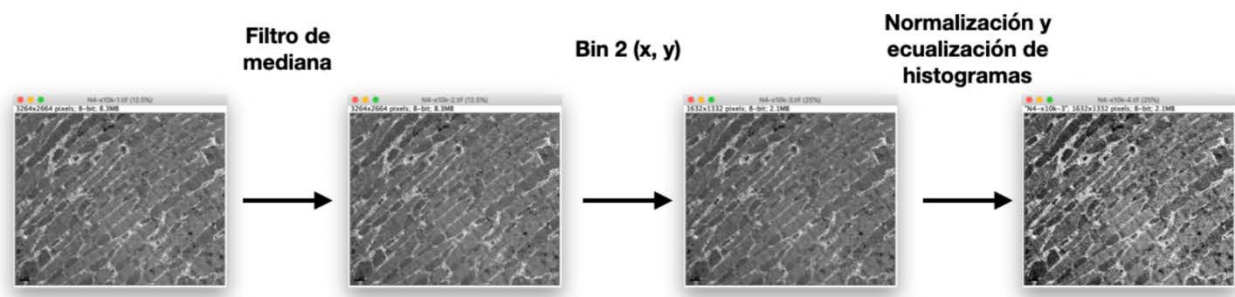


Figura 9. Flujo de trabajo de preprocesamiento de imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

Luego las imágenes se calibraron y se segmentaron manualmente para delimitar la forma de cada mitocondria. Las regiones de interés obtenidas de esta manera fueron cuantificadas para el área, el diámetro de Feret máximo y mínimo, la relación de aspectos y la circularidad (Figura 10). La longitud sarcomérica se midió como la distancia entre dos discos Z consecutivos. Posteriormente, se evaluó la normalidad para las poblaciones de las variables medidas y al no cumplir con esta condición todos los datos obtenidos de las imágenes de MET, así como las pruebas estadísticas realizadas con ellos, se trataron como no paramétricos.

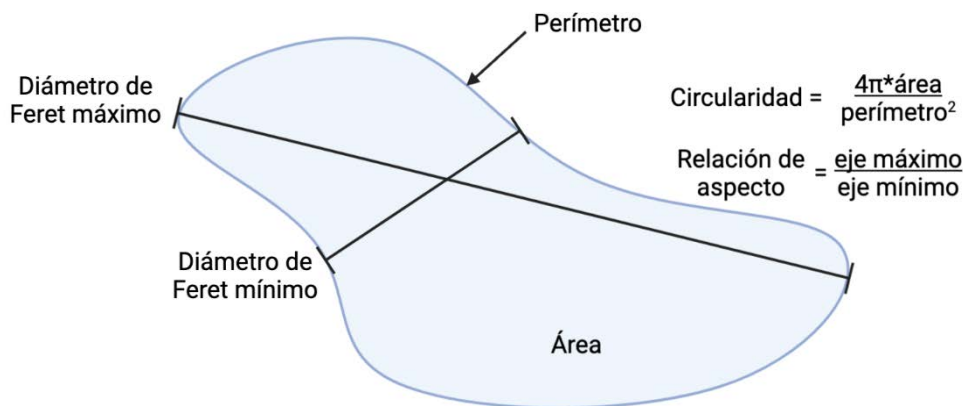


Figura 10. Esquema de valores morfométricos cuantificados en las regiones de interés en imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

3.9 Cuantificación del grado de ordenamiento mitocondrial

Se realizaron tres diferentes estrategias sobre las imágenes de MET. Antes de aplicar las distintas estrategias se procesaron las imágenes con un algoritmo que permitió la obtención de imágenes binarizadas. El algoritmo fue aplicado por medio de un macro, que toma las mitocondrias segmentadas manualmente de una imagen (ver apartado anterior), se rellena cada una y se las combina en una sola región de interés más grande. Posteriormente se dibuja esta región en la imagen de MET y se establece un umbral para binarizarla, obteniendo así una imagen con fondo negro y las mitocondrias -región de interés- en blanco.

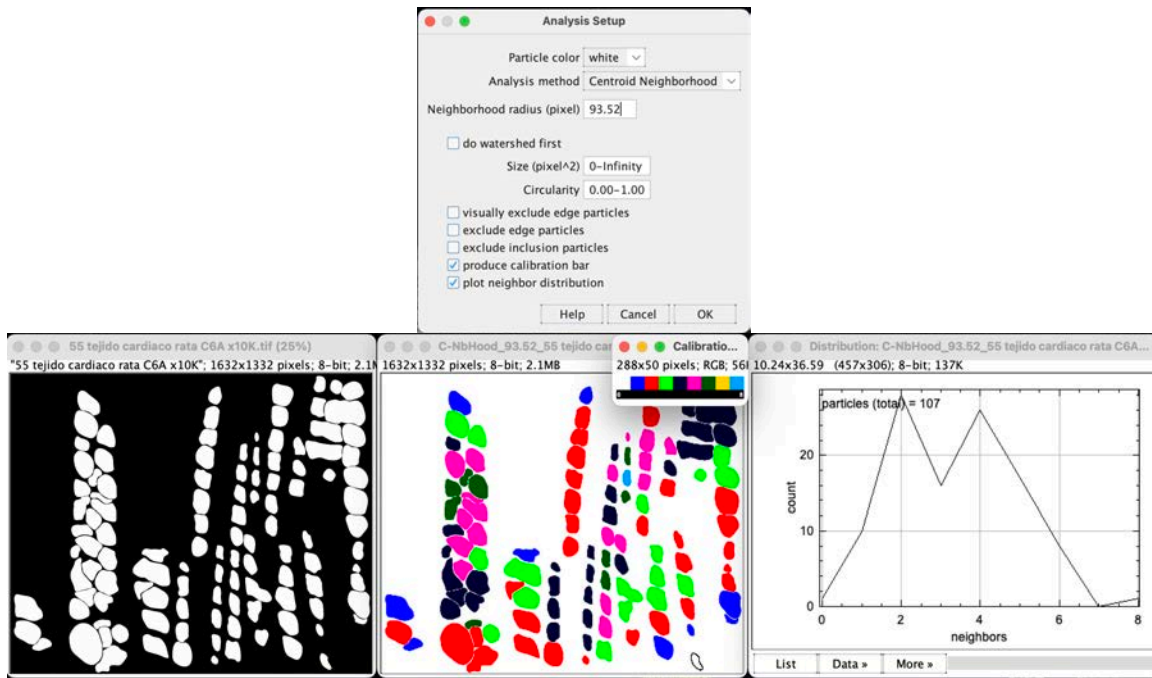


Figura 11. Esquema de trabajo para la determinación de la cantidad de vecinos por mitocondria.

La primera estrategia consistió en determinar el número de mitocondrias vecinas que tiene una mitocondria determinada. Para este fin se utilizó el *plug-in* de *Neighbor Analysis*, dentro de *BioVoxel Toolbox*²⁰⁴ en FIJI. Esta herramienta tiene tres requerimientos básicos, además de alguna configuración extra (Figura 11): una imagen binarizada con las regiones de interés, el método de análisis y el radio de vecindad. El método de análisis fue vecindad por centroide, es decir que se utilizó el centroide de las regiones de interés como punto a partir del cual si dos mitocondrias están a una distancia igual o menor al radio de vecindad son consideradas como vecinas. Por último, como radio de vecindad se utilizó la mediana de la distancia al vecino más cercano (*Median Nearest Neighbor Distance* o MNND), la cual fue calculada previamente con un algoritmo presente también en FIJI. El *plug-in* calcula cuántas partículas están dentro de la distancia establecida y genera un mapa de colores y una distribución a partir de la cual se puede calcular la frecuencia de cantidad de vecinos para las mitocondrias de cada imagen analizada.

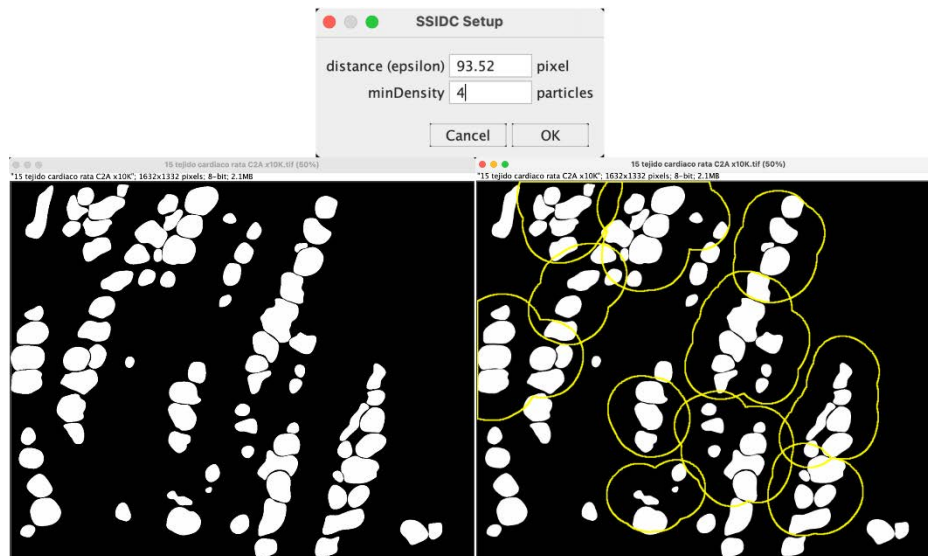


Figura 12. Determinación de agrupamientos mitocondriales con el plugin SSIDC Cluster Indicator.

La segunda estrategia consistió en determinar la existencia de “clusters” o agrupamientos mitocondriales en las imágenes de MET (Figura 12). Para determinar la cantidad de clusters por campo se utilizó otro *plug-in* en *BioVoxel Toolbox* llamado *SSIDC Cluster Indicator*. Se utilizaron las mismas imágenes binarizadas que en la estrategia anterior. Al correr el *plug-in* éste solamente requiere dos parámetros que son la distancia (épsilon) en píxeles que va a fungir como punto de corte entre regiones de interés vecinas y la mínima densidad (minDensity) de partículas en un cluster. Se utilizó la MNND como punto de corte de distancia entre vecinos y se consideraron como clusters aquellas agrupaciones que tenían al menos 4 mitocondrias. Una vez el *plug-in* termina de procesar la imagen se obtiene la imagen binarizada con los clusters marcados en amarillo, de esta forma se cuantificó la cantidad de clusters por campo.

La última de las estrategias utilizadas para evaluar el grado de ordenamiento mitocondrial consistió en cuantificar la entropía global de Shannon (GSE) de las distintas imágenes binarizadas ²⁰⁵. Brevemente, la GSE es una medida de la uniformidad de la distribución de las partículas en una imagen y se obtiene como la sumatoria de las probabilidades de que una partícula esté en un determinado cuadrante. Si los valores de GSE se acercan a 1 indica que la distribución de las

partículas es uniforme y, por el contrario, si es cercano a 0 indica que la distribución no es uniforme y que las partículas podrían estar formando cúmulos o clusters. Para esto se desarrolló otro macro ([Anexo B](#)) que permite la obtención de la cantidad de centroides de partículas en un determinado cuadrante. Con este macro se utilizan las regiones de interés -mitocondrias individuales- y se obtiene el centroide de cada una. Cabe recalcar que se utilizaron solamente imágenes donde las mitocondrias se encuentran dispersas en todo el campo, puesto que de lo contrario se estarían obteniendo cuadrantes con baja probabilidad de existencia de mitocondrias la cual no se deberían a que las mitocondrias no están ubicadas ahí sino, por ejemplo, porque en esa área se localiza un núcleo y es físicamente imposible que mitocondrias estén ocupando ese espacio. Luego el macro cuantifica cuántas de esas partículas se encuentran dentro de un cuadrante de una determinada área. La cantidad de cuadrantes es determinada por el operador, todos deben tener la misma área y debe haber la misma cantidad en cada eje, por ejemplo, si se usan grillas 3x3 cuadrantes se obtienen así 9 cuadrantes que dividen la imagen en partes iguales. Esto se utiliza posteriormente para calcular la probabilidad de que una partícula esté dentro de un determinado un cuadrante (p_i), la cual junto con el número de cuadrantes (q) permite calcular la GSE mediante la siguiente ecuación ²⁰⁵:

$$GSE = - \frac{[\sum_{i=1}^q p_i \log(p_i)]}{\log(q)}, p_i = \frac{x_i}{\sum_{i=1}^q x_i}$$

3.10 Aislamiento de mitocondrias miocárdicas

Una parte del ventrículo izquierdo se lavó y homogeneizó manualmente a 4 °C en la solución de aislamiento (Sacarosa 75 mM, Manitol 225 mM, EGTA 0.1 mM, TRIS 10 mM, pH 7.3). El homogenato se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. El sobrenadante se centrifugó nuevamente 8000 rpm por 10 min para sedimentar las mitocondrias. Por otro lado, el *pellet* se lavó y resuspendió en la solución de aislamiento y se centrifugó nuevamente a 8000 rpm por 5 min. Al finalizar, este nuevo *pellet* se lavó y resuspendió en la solución de aislamiento sin EGTA. La pureza del aislamiento se

determinó por MET y por inmunoblot (ver más abajo) con la detección del canal aniónico dependiente de voltaje de la membrana externa mitocondrial (VDAC) y la ausencia de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica (GAPDH).

3.11 Estimación del potencial de membrana mitocondrial

El $\Delta\Psi_m$ se evaluó en un espectrofluorómetro midiendo la fluorescencia de Rhodamina-123 (Ex/Em: 503/527 nm), una sonda catiónica que ingresa a la mitocondria de forma dependiente del $\Delta\Psi_m$, cuanto más negativo es este parámetro existe un mayor ingreso de la sonda. Para la medición, en una cubeta con agitación a 30 °C conteniendo buffer (KCl 120 mM, MOPS 20 mM, TRIS 10 mM, KH_2PO_4 5 mM, pH 7.3), succinato 10 mM y Rhodamina-123 0,1 μM se midió la fluorescencia basal. Luego se agregaron entre 100 y 200 μg de mitocondrias aisladas, una vez estabilizada la señal se centrifugó el contenido de la cubeta a 15000 rpm por 1 min, con el fin de obtener un sobrenadante libre de mitocondrias, y se volvió a medir la fluorescencia en el sobrenadante obteniéndose así la fluorescencia final. Con estas dos medidas y la ecuación de Nernst-Guggenheim se estimó el $\Delta\Psi_m$ ²⁰⁶.

3.12 Capacidad de retención de Ca^{2+}

Se determinó como la cantidad de Ca^{2+} que puede retener la mitocondria antes de una apertura sostenida del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP). El Ca^{2+} fuera de la mitocondria fue sentido con el indicador impermeable Calcium Green-5N (Ex/Em: 506/532). Para la medición, a una cubeta con agitación a 37 °C conteniendo buffer (KCl 120 mM, MOPS 20 mM, TRIS 10 mM, KH_2PO_4 5 mM, pH 7.3), succinato 10 mM y Calcium Green 0.5 μM se le añadió 200-300 μg de mitocondrias aisladas y una vez estabilizada la señal se agregaron pulsos de Ca^{2+} , hasta lograr la apertura irreversible del mPTP. Cabe mencionar que a cada agregado de Ca^{2+} la fluorescencia aumenta por interacción con el fluoróforo y luego disminuye paulatinamente por el ingreso de este ion a la mitocondria, esto se repite hasta que

la cantidad de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial promueve la apertura del mPTP con lo que la fluorescencia aumenta de forma abrupta por la liberación del contenido mitocondrial. La capacidad de retención de Ca^{2+} se expresó como nmol de Ca^{2+} /mg de proteína.

3.13 Contenido de Ca^{2+} mitocondrial

Se estimó según lo publicado por Korde y colaboradores²⁰⁷. Se realizó una curva de calibración con la sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} , Calcium Green-5N (Ex/Em: 506/532) con distintas concentraciones de este ion. Para cuantificar el contenido de Ca^{2+} en mitocondrias aisladas se agregaron 50 μg en buffer (KCl 120 mM, MOPS 20 mM, TRIS 10 mM, KH_2PO_4 5 mM, pH 7.3). Durante 10 min se incubó con Tritón X-100 para permitir la salida del Ca^{2+} de la matriz mitocondrial. La diferencia de fluorescencia antes y después de la solubilización de las membranas con el Tritón X-100 se utilizó para cuantificar el contenido de calcio mitocondrial.

3.14 Ensayo de hinchamiento mitocondrial

Este ensayo consiste en provocar el hinchamiento de la matriz mitocondrial inducido por la apertura del mPTP por un agregado de Ca^{2+} . La apertura del mPTP produce que entre buffer dentro de la matriz mitocondrial aumentando el volumen de la organela generando un aumento en la transmitancia, lo que se puede registrar como disminución en la absorbancia a 540 nm de las mitocondrias en suspensión. Partiendo de mitocondrias aisladas se sembró 0.5 mg/ml de proteína en una cubeta de espectrofotometría con agitación a 37 °C con buffer (KCl 120 mM, MOPS 20 mM, TRIS 10 mM, KH_2PO_4 5 mM, pH 7.3) y succinato 10 mM. Se midió la absorbancia a 540 nm durante 300 segundos. A los 100 segundos, se agregó un pulso de Ca^{2+} de concentración conocida. Luego, se calculó la diferencia de absorbancia entre la absorbancia basal y luego del pulso de Ca^{2+} , una vez estabilizada la señal.

3.15 Extracción de lípidos mitocondriales

Los lípidos totales de las distintas muestras se extrajeron por el método de Folch²⁰⁸. Brevemente, se agregó 1 volumen de muestra a 20 volúmenes de cloroformo-metanol (2:1, v/v). La mezcla resultante se agitó con vórtex y se filtró con papel de filtro. Luego se agregó al filtrado un 20 % de su volumen de agua, se agitó por inversión y se dejó toda la noche a 4 °C para permitir la separación de dos fases: una superior acuosa (mezcla metanol y agua) y una inferior (cloroformo). La fase superior se separó por sifonación y la inferior, conteniendo el extracto lipídico, se llevó a sequedad mediante gaseo con N₂. Dicho extracto lipídico se resuspendió en cloroformo y se almacenó a -20 °C en atmósfera de N₂, para su posterior análisis.

3.16 Cromatografía de capa fina de alta performance (HP-TLC)

Las diferentes clases de lípidos extraídos se separaron por HP-TLC utilizando placas de vidrio de 20 x 10 cm y silicagel G como fase estacionaria. Las placas se lavaron con acetona y se activaron durante 1 hora a 120 °C. Se utilizó como fase móvil la siguiente mezcla de solventes: cloroformo-acetona-metanol-ácido acético-agua (6:8:2:2:1, v/v)²⁰⁹. Las cubas de desarrollo se saturaron con la mezcla de solventes previo a la corrida. Los lípidos se sembraron en forma puntual en las placas. El tiempo de desarrollo de la corrida cromatográfica fue de aproximadamente 60 min, hasta que el frente de corrida estuviera a menos de 1 cm del borde superior de la placa.

El revelado de las manchas se realizó mediante *charring* (carbonizado) con H₂SO₄ 95% en etanol durante 10 seg. Se calcinó en horno a 140 °C por 15 min. Las zonas en las cuales había lípidos se tornaron más oscuras, distinguiéndose del fondo claro de la placa. Este procedimiento no permite la identificación exacta de los distintos lípidos, pero sí permite comparar los R_f -distancia con el frente de corrida-

con los estándares que se siembran en forma simultánea en la misma placa. La cuantificación se hizo por densitometría con el software de análisis de imágenes Fiji.

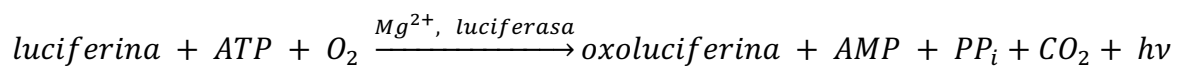
Utilizando esta metodología se separaron en la placa de lípidos polares las siguientes clases: la fracción correspondiente a lípidos neutros, que quedó en el frente de corrida, y el resto de los lípidos que corrieron en mayor o menor medida con la fase móvil según su polaridad, a saber: CL, PE, PS y PC.

3.17 Acidificación de la matriz mitocondrial

Mitocondrias aisladas fueron cargadas durante 15 min con el indicador fluorescente sensible a pH, BCECF-AM (Ex/Em: 440-490/535). Luego fueron expuestas a un buffer ácido (KCl 120 mM, MOPS 20 mM, TRIS 10 mM, KH₂PO₄ 5 mM, pH 6.8) para promover la acidificación de la matriz mitocondrial. Se obtuvo la cinética de fluorescencia y se cuantificó la velocidad de la acidificación normalizada por la masa de mitocondrias aisladas.

3.18 Contenido mitocondrial de ATP

Se realizó a partir de mitocondrias aisladas mediante un kit comercial (Thermo Fisher #A22066) basado en la reacción quimioluminiscente de la enzima luciferasa que se muestra a continuación:



La reacción se llevó a cabo en un buffer conteniendo Tricina 25 mM, MgSO₄ 5 mM, EDTA 0.1 mM y NaN₃ 0.1 mM a pH 7.8. Al cual se le agregó DTT 1 mM, D-luciferina 0.5 mM y luciferasa 0.125 mg. Se hizo una curva de calibración con estándares de ATP, a partir de la cual se estimó la concentración de ATP y se informó cómo nM/mg proteína.

3.19 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método de *salting out*. Para ello, se homogeneizaron entre 20-30 mg de miocardio aproximadamente en un buffer salino (NaCl 400 mM, TRIS 10 mM, EDTA 2 mM). Luego al homogenato se agregó SDS 2% y proteinasa K 400 µg/ml. Se incubaron las muestras 1,5 h a 60 °C y seguido a ello se adicionó NaCl 6M. Después, se centrifugó por 30 min a 10.444 x g y se recuperó el sobrenadante y se agregó isopropanol. Se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 20 min a 4 °C. Por último, el pellet se lavó con Etanol 70% y se resuspendió en buffer TE (Tris 10 mM/EDTA1mM).

Para la determinación de la concentración de ADN por espectrofotometría se utilizó el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), a partir de una alícuota de 1 µl de muestra. El equipo permite medir, además de la concentración, la pureza del ADN mediante la determinación de la relación de absorbancia a 260 nm para ácidos nucleicos y absorbancia a 280 nm para proteínas (A260/A280), la cual si es del orden de 1,8 indica una adecuada pureza del ADN obtenido.

3.20 Extracción de ARN

A partir de 20-30 mg de ventrículo aproximadamente previamente guardado en solución RNAlater (Qiagen) a -70 °C para su preservación, se obtuvo ARN total utilizando TRIzol Reagent (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. En este protocolo se utilizaron puntas de pipeta con filtro estériles y agua libre de nucleasas para prevenir la contaminación y/o degradación del ARN. La concentración obtenida del ARN y su pureza fue determinada de la misma forma que para el ADN (sección anterior).

3.21 Transcripción reversa

A partir de esta reacción se obtiene una cadena de ADN complementaria (ADNc) a la del ARNm que codifica el gen de interés. El ADNc obtenido sirve como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este procedimiento se utilizó la enzima M-MLV (Thermo Fisher 28025-013), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.22 PCR cuantitativa en tiempo real

Se cuantificó la expresión por RT-PCR cuantitativa en tiempo real de los ARNm de: el coactivador 1- α del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1- α), la proteína relacionada a la dinamina 1 (DRP1), mitofusina 1 (MFN1), la quinasa 1 activada por PTEN (PINK-1), péptido natriurético atrial (ANP), la cadena pesada de miosina β (β -MHC) y las isoformas 1 y 3 de colágeno (col1a1 y col3a1, respectivamente). La expresión se normalizó por la expresión de GAPDH.

Por otro lado, a partir del ADN extraído se estimó la densidad mitocondrial relativa, como la relación de ADN mitocondrial vs. ADN nuclear (ADNm/ADNn). Utilizando NADH deshidrogenasa 1 (ND1) y β -actina, como genes representativos de mitocondria y de núcleo respectivamente.

En todos los casos, para cuantificar la amplificación de los genes estudiados se utilizó SYBR Green I (Molecular Probes) (Ex/Em: 480/520 nm) como sonda que unida al surco menor del ADN doble cadena emite fluorescencia al ser excitada a 480 nm. Los cebadores utilizados para la amplificación de ARNm, ADNm y ADNn, así como la longitud de los amplicones se muestran en la [Tabla 1](#). La RT-PCR se llevó a cabo con ARN o ADN purificado según los incisos anteriores.

Tabla 1. Genes, secuencias utilizadas como primers y longitud del amplicón.

Gen	Secuencia	No. Acceso banco de genes	Longitud (PB)
ND1	F-ATTCTAGCCACATCAAGTCTTT R-GGAGGACGGATAAGAGGATAAT	NC_001665.2	151
β -Actin (Actb)	F-GAAATCGTGCGTGACATTAAAG R-ATCGGAACCGCTCATTG	NM_031144.3	151
Dnm1 (DRP1)	F-CGTAGTGGGAACTCAGAGCA R-TGGACCAGCTGCAGAATAAG	XM_006248724.3	120
Ppargc1a (PGC1 α)	F-TTCAGGAGCTGGATGGCTTG R-AGATCTGGGCAAAGAGGCTG	XM_017599390.1	104
Pink1	F-CCAAACACCTTGGCCTTCTA R-CTTAAGATGGCTTCGCTGGA	NM_001106694.1	148
Mfn1	F-CGGAGGCATATGAAAGTGGC R-CCATCAGTTCCTCCACACT	NM_138976.1	143
GAPDH	F-GGGTGTGAACCACGAGAAAT R-CCACAGTCTTCTGAGTGGCA	XM_017593963.1	167
ANP	F-GGATTTCAAGAACCTGCTAGACCA R-CTGCTTCCTCAGTCTGCTCACTCA	NM_012612.2	98
β -MHC	F-CGGACCTTGGAAGACCAGAT R- GACAGCTCCCCATTCTCTGT	XM_063274187.1	116
Col1a1	F-ATCAGCCCAAACCCCAAGGAGA R-CGCAGGAAGGTCAGCTGGATAG	NM_053304.1	128
Col3a1	F- TGATGGGATCCAATGAGGGAGA R-GAGTCTCATGGCCTTGCGTGTTT	NM_032085.1	143

3.23 Cuantificación de proteínas totales

Se utilizó el método de Bradford ²¹⁰, que se basa en la unión del colorante Coomassie Brillante G-250 a los residuos básicos de las proteínas en condiciones ácidas. Al ocurrir la interacción se produce el cambio de color de la solución de marrón a azul, por cambios en la estructura del colorante presentando un máximo de absorbancia a 595 nm. La absorbancia a esa longitud de onda es proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la solución. Para la cuantificación de la concentración de proteínas en las muestras se utilizó una curva de calibración con

albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich). Las medidas se realizaron en un lector de placas (Thermo Scientific Varioskan LUX).

3.24 Producción de ROS en ventrículo izquierdo y mitocondrias aisladas

En ventrículo izquierdo, 100 mg de tejido se homogeneizaron con buffer Tris-HCl (40 mM, pH 7.4 a 4 °C). Luego se incubaron por 30 min a 37 °C con la sonda sensible a ROS, H₂DCFDA 5 μM²¹¹. Se midió fluorescencia a punto final (Ex/Em: 495/520) y se normalizó por la cantidad de proteína medida por Bradford.

En mitocondrias aisladas, 100 μg de mitocondrias se agregaron a buffer (KCl 120 mM, MOPS 20 mM, TRIS 10 mM, KH₂PO₄ 5 mM, pH 7.3) con H₂DCFDA 5 μM. Se midió cinética de la fluorescencia cada 30 seg durante 15 min a 37 °C. Luego de los primeros 5 min se agregó succinato 5 mM. Después a los 10 min se agregó FCCP 5 μM. Se normalizaron los valores de fluorescencia (F) como F/F₀ y se calcularon las pendientes normalizadas por la cantidad de proteína sembrada sin sustrato, después del succinato y después del FCCP, estas corresponden a la producción de ROS en las mitocondrias aisladas en estado basal, energizadas y desacopladas respectivamente¹⁴⁵.

3.25 Actividad de citrato sintasa

La enzima citrato sintasa (CS) es mitocondrial, pertenece al ciclo de Krebs y genera la producción de citrato a partir de oxalacetato y acetil-CoA. El aumento de la actividad de esta enzima es ampliamente utilizado como marcador de entrenamiento en modelos de ejercicio²¹²⁻²¹⁴. Su actividad se determinó en homogenatos de músculo esquelético y de ventrículo izquierdo (30 mg por muestra, aproximadamente) almacenados a -70 °C²¹⁵. Los tejidos se homogeneizaron en hielo con 20% peso/volumen de buffer (HEPES 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4). Para

producir la liberación de la CS de la matriz mitocondrial los homogenatos se congelaron por 1 h a -20°C y se diluyeron 1:10. Las medidas se realizaron según lo descrito por Eigentler *et al*²¹⁶, excepto que los volúmenes de ensayo fueron de 150 μL .

Brevemente, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente con 125 μL de buffer de reacción (5,5'-Ditio-bis (2-nitrobenzoico) o DTNB 0.1 mM, acetil-CoA 0.1 mM y 0.25% Tritón X-100, pH 8.1) y se comenzó con el agregado de oxalacetato 0.5 mM. El DTNB reacciona con la Coenzima A, liberada por la reacción del acetil-CoA con el oxalacetato mediada por la enzima CS, formando TNB, un compuesto de color amarillo con un pico de absorbancia a 412 nm. La reacción se monitorizó midiendo la absorbancia a esta longitud de onda durante 100 s con un espectrofotómetro (SmartSpect 3000, BioRad). La actividad enzimática se expresó como unidades internacionales en función del tiempo (IU, $\mu\text{mol}/\text{min}$), siendo que 1 IU de CS produce un 1 μmol de citrato por minuto.

3.26 Actividades de superóxido dismutasas 1 y 2

La familia enzimática superóxido dismutasas se encarga de eliminar el radical superóxido (O_2^-) convirtiéndolo en H_2O_2 y O_2 ; por lo tanto, cumplen un rol como antioxidantes a nivel celular. Entre las principales superóxido dismutasas se encuentran la citosólica, SOD1 o Cu-Zn-SOD, y la mitocondrial, SOD2 o Mn-SOD. Siendo esta última sensible a la inhibición por KCN.

Se homogeneizaron aproximadamente 75 mg de ventrículo izquierdo en 1 ml de buffer (KCl 150 mM, Tritón X-100 10% p/v). Luego el homogenato se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Se recolectó el sobrenadante y se congeló el homogenato a -70°C hasta su uso²¹⁷. La actividad de las dos isoformas de la superóxido dismutasa se determinó en presencia o ausencia de KCN 5 mM por inhibición de la producción de formazán, compuesto producido por la oxidación de NBT con O_2^- a pH 10.2. La reacción comenzó por la adición de Xantina oxidasa como fuente de O_2^- y se registró la absorbancia a 560 nm cada 10 segundos por 2 min⁸⁵.

3.27 *Actividad de catalasa*

Se adaptó el método de Aebi ²¹⁸ para realizar el ensayo en placa de múltiples celdas. Este método se basa en medir la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) catalizada por la enzima catalasa. La mezcla de reacción contenía: buffer (KH_2PO_4 50 mM, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 50 mM, pH 7.4), H_2O_2 0.216% y la muestra. Las muestras se homogeneizaron como se indicó en la sección anterior. Se realizaron lecturas de absorbancia a 240 nm, longitud de onda en que absorbe el H_2O_2 , en intervalos de 10 segundos durante 1 minuto. La actividad específica de la enzima catalasa se consideró como la velocidad de caída de la absorbancia normalizada por mg de proteína y se expresa como porcentaje respecto al control.

3.28 *Western blot*

Mediante esta técnica se evaluó tanto la expresión proteica como la fosforilación de algunas proteínas claves en las vías de señalización intracelular estudiadas en mitocondrias aisladas, la fracción citosólica y ventrículos izquierdos. Durante todo el protocolo las muestras fueron mantenidas en hielo para inhibir la actividad de las proteasas, y evitar así la degradación de las proteínas. Los ventrículos izquierdos previamente preservados a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ se colocaron en un volumen, en μL igual a 4 veces el peso del tejido en mg de buffer, de homogeneización (KH_2PO_4 30 mM, NaF 25 mM, EDTA 5 mM, sacarosa 300 mM, Tritón X-100 0.01 %, Igepal 1 %, cóctel inhibidor de proteasas Roche 1x). Se homogeneizó a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en hielo utilizando un homogeneizador mecánico (PRO250 Pro Scientific Inc.) durante 15 seg con intervalos de pausa de 30 seg repitiéndolo 4 veces. Los homogenatos fueron centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en una centrífuga de mesada (Micro 17R Micro High Speed Centrifuge). El pellet de cada tubo se descartó y en el sobrenadante se cuantificó proteínas y se guardó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior utilización.

Para la preparación de las muestras para el Western blot, los homogenatos se descongelaron en hielo. Luego, se tomó un volumen de cada muestra para sembrar en todas las calles del gel el mismo volumen en μL , se añadió Sample Buffer 5X (TRIS 62.5 mM, glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, dodecilsulfato de sodio (SDS) 2 %, azul de bromofenol, pH 6.8) y agua, si fuese necesario, para lograr que todas las muestras por corrida tengan la misma concentración de proteínas. El buffer de carga contenía SDS, lo que permite la desnaturalización de las proteínas porque las cubre con cargas negativas.

Las muestras preparadas se corrieron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), para lo cual se prepararon geles de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida) de 10 o 15 calles y 1.5 mm de espesor. Los geles contienen dos segmentos: uno superior o de *stacking* que permite el compactamiento de las muestras y uno inferior o de corrida donde las proteínas son separadas según su peso molecular.

Generalmente, en cada calle del gel se sembró un volumen de muestra correspondiente a 60 μg de proteína y en otra un patrón de peso molecular (Precision Plus Protein Prestained Standards, Dual Color, Bio-Rad Laboratories). La corrida electroforética se realizó durante 15 min a 80 V y luego por 90 min aproximadamente a 100 V (Mini-PROTEAN Systems, Bio-Rad Laboratories) en buffer de corrida (TRIS 50 mM, Glicina 150 mM, SDS 0.1%). Luego se realizó la transferencia a membranas de PVDF activadas (Millipore) en un equipo de transferencia semi húmedo a 12 V por 1 h con buffer de transferencia (TRIS 25 mM, Glicina 195 mM, metanol 10%). Posteriormente, las membranas se bloquearon con TTBS con 5 % de leche descremada por 1 h y se dejaron incubando por 18 h a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes a las proteínas de interés. Luego se hicieron 3 lavados por 10 min con TTBS y se incubaron a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios que cuentan con la peroxidasa del rábano adherida a su estructura. Las membranas se revelaron con el sustrato comercial de la peroxidasa (Immobilon, Millipore) en un equipo para quimioluminiscencia (Chemidoc, BioRad). Las imágenes fueron analizadas mediante el software Image Lab (BioRad).

3.29 Aislamiento de cardiomiocitos adultos

Partiendo de ratas de 5-6 meses de edad anestesiadas con una inyección de uretano peritoneal (1.5g/kg de peso del animal). Los animales fueron sometidos a la apertura de la caja torácica y heparinizados (200U/ml) para evitar la formación de coágulos. Luego, se extrajo el corazón y rápidamente se canuló la aorta y se colocó en un sistema tipo Langendorff de perfusión retrógrada. El corazón fue lavado con una solución buffer (NaCl 146.2 mM, KCl 4.69 mM, glucosa 11 mM, HEPES 10 mM, NaH₂PO₄·H₂O 0.35 mM, MgSO₄·7H₂O 1.05 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.4, con burbujeo de O₂ y 37 °C). Posteriormente se perfundió una solución de EGTA 0.1 mM para quelar en Ca²⁺. Luego de 5 min, se perfundió el mismo buffer anterior, pero con CaCl₂ 0.5 mM y 0.2 mg/ml de colagenasa tipo II 280U/ml (Worthington Biochemical). El corazón digerido se desmontó y fue disgregado mecánicamente. De forma progresiva se restituyó el Ca²⁺ hasta llegar nuevamente a 1 mM.

3.30 Medidas de ROS y $\Delta\Psi_m$ en cardiomiocitos aislados

Los cardiomiocitos aislados fueron incubados con H₂DCFDA 5 μ M para medir ROS o con TMRE 100 nM para medir $\Delta\Psi_m$ durante 30 min a 37 °C. Luego las células se lavaron con el buffer de aislamiento conteniendo 1 mM de Ca²⁺ para eliminar alguna sonda residual en el sobrenadante. Para la cuantificación de ROS se midió en lector de placas o en microscopio confocal en epifluorescencia (Ex/Em: 495/520) antes y después del agregado de distintos estímulos cada 30 seg y se estimaron las velocidades de producción de acuerdo con la pendiente de la curva. Para la medición del $\Delta\Psi_m$ se midió la fluorescencia de TMRE también en lector de placas o en el microscopio confocal en epifluorescencia (Ex/Em: 545/575) en punto final.

3.31 Análisis estadístico, gráficos y esquemas

Los resultados están expresados como media \pm error estándar de la media (n) - $X \pm SEM$ (n) -, y se realizó un test de normalidad Anderson-Darling para determinar si la distribución de los datos era normal. Si la muestra tenía una distribución normal se utilizó el test de t de Student (t-Test) para determinar la significancia estadística, de lo contrario, se utilizó el test Mann-Whitney. Además, si la varianza entre las poblaciones de los grupos era diferente se utilizó el test de Welch (Welch's test). Los resultados de MET están expresados como mediana (rango intercuartil) (n) -med (IQR) (n) -, puesto que las poblaciones no siguen una distribución normal. En caso de corresponder se hicieron test ANOVA de una o dos vías. Se consideró diferencias estadísticamente significativas cuando el $p < 0.05$. Los gráficos están hechos con el formato "*box and whiskers*", donde la línea que corta la caja representa la mediana y la cruz el promedio. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software Graphpad Prism 10, San Diego, California USA, www.graphpad.com. Los esquemas fueron realizados con www.BioRender.com.

4. Resultados

4.1 Valores morfométricos y controles del protocolo de entrenamiento

El entrenamiento aeróbico de natación durante 8 semanas aumentó la ingesta calórica en los animales entrenados (E) respecto al grupo sedentario (S). Sin embargo, los primeros registraron un menor aumento del peso corporal al finalizar el protocolo ([Tabla 2](#)).

A fin de confirmar que el entrenamiento realizado era de tipo aeróbico, se evaluó la actividad de la enzima de la matriz mitocondrial CS en el músculo sóleo. Este es un músculo rojo, es decir, que tiene un gran número de mitocondrias y, por ende, está mayormente involucrado en los entrenamientos aeróbicos y de resistencia, ya que la producción energética ocurre principalmente a nivel de estas organelas. En cambio, en los músculos blancos que se ponen en juego en los entrenamientos anaeróbicos, la producción de energía proviene principalmente de reacciones citosólicas. Los animales del grupo E tuvieron una mayor actividad muscular de CS comparado con los animales del grupo S ([Tabla 2](#)).

Debido a que los protocolos de entrenamiento en cinta o de natación pueden ser cuestionados por, eventualmente, producir estrés en los animales al ser forzados a realizarlos, se evaluó la presencia de hipertrofia de las glándulas adrenales como marcador indirecto de estrés crónico. En condiciones de ejercicio forzado la adrenocorticotrofina (ACTH), hormona estimulante de las glándulas suprarrenales, podría estar aumentada por la activación crónica del mecanismo de lucha o huida, lo que producirían a largo plazo la hipertrofia de las glándulas adrenales²¹⁹. Entonces, se midió el peso de las glándulas adrenales normalizado por la longitud de la tibia en ambos grupos, y no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos ([Tabla 2](#)).

Variable	Sedentarias	Entrenadas
Ingesta calórica (kCal/día)	59.26 ± 1.94 (48)	64.32 ± 1.46 (48) *
Δ Peso (g)	50.65 ± 6.36 (15)	33.23 ± 4.27 (15) *
Actividad citrato sintasa soleus ¹ (μmol/min*mg)	0.243 ± 0.005 (6)	0.267 ± 0.006 (6) *
P _{adr} /LT (mg/mm)	1.42 ± 0.04 (17)	1.51 ± 0.05 (16)

Tabla 2. Valores morfométricos y control de entrenamiento y estrés del modelo. Media±SEM (n). *: $p < 0.05$, t-Test.

Con estos resultados, podemos concluir que los animales del grupo E efectivamente se entrenaron con el protocolo de las 8 semanas de natación implementado, en ausencia de estrés crónico significativo. Las evidencias al respecto son: el aumento de la actividad de CS en musculo esquelético, el aumento en la ingesta calórica con disminución del peso corporal y la ausencia de hipertrofia suprarrenal, en este grupo, comparado con el grupo S (Tabla 2).

4.2 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre los valores de la presión arterial y la masa y función cardíacas

Dado que el entrenamiento aeróbico genera una sobrecarga hemodinámica de volumen -por aumento del retorno venoso- capaz de inducir el remodelado fisiológico del corazón, se registró el peso del corazón entero y del ventrículo izquierdo a fin de explorar la presencia de hipertrofia cardíaca. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos experimentales en el peso del corazón normalizado por el peso corporal de cada animal (mg/g, S: 4.256 ± 0.076 (17), E: 4.646 ± 0.106 (17)) (Figura 13A). Dado que también se registraron diferencias

significativas entre ambos grupos en el peso corporal al finalizar el período experimental, se procedió a evaluar el peso del corazón y del ventrículo izquierdo normalizados por la longitud de la tibia, de forma de independizarnos de las variaciones en el peso corporal inducidas por el entrenamiento. De esta manera, no se registraron diferencias significativas en los cocientes entre los pesos del corazón/longitud de la tibia (mg/mm, S: 35.98 ± 0.63 (17), E: 36.90 ± 0.67 (17)) ni pesos del ventrículo izquierdo/longitud de la tibia (mg/mm, S: 28.89 ± 0.53 (17), E: 29.75 ± 0.51 (17)) entre ambos grupos de animales, al finalizar las 8 semanas del protocolo experimental ([Figura 13B](#) y [13C](#)). Debe recordarse que, por tratarse de una cepa de ratas hipertensas, ambos grupos experimentales presentan hipertrofia cardíaca, y que resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que el protocolo de entrenamiento no induce la regresión de la hipertrofia cardíaca patológica, sino que la transforma hacia un fenotipo fisiológico.

Para evaluar si el protocolo de entrenamiento aeróbico afectó la presión arterial de los animales se midió, mediante la técnica indirecta del brazalete en la cola (*Tail-cuff method*), la PAS antes y después de las 8 semanas del protocolo experimental. Se encontró que en los animales sedentarios la PAS aumentó con la edad, mientras que en los entrenados esto se previno (mmHg, S_{inicio}: 172.67 ± 7.42 (17), S_{final}: 197.44 ± 4.66 (17), E_{inicio}: 185.70 ± 6.26 (17), E_{final}: 188.27 ± 5.93 (17)) (mmHg, S: 24.77 ± 5.05 (17), E: 2.57 ± 6.17 (17)) ([Figura 13D](#) y [13E](#)).

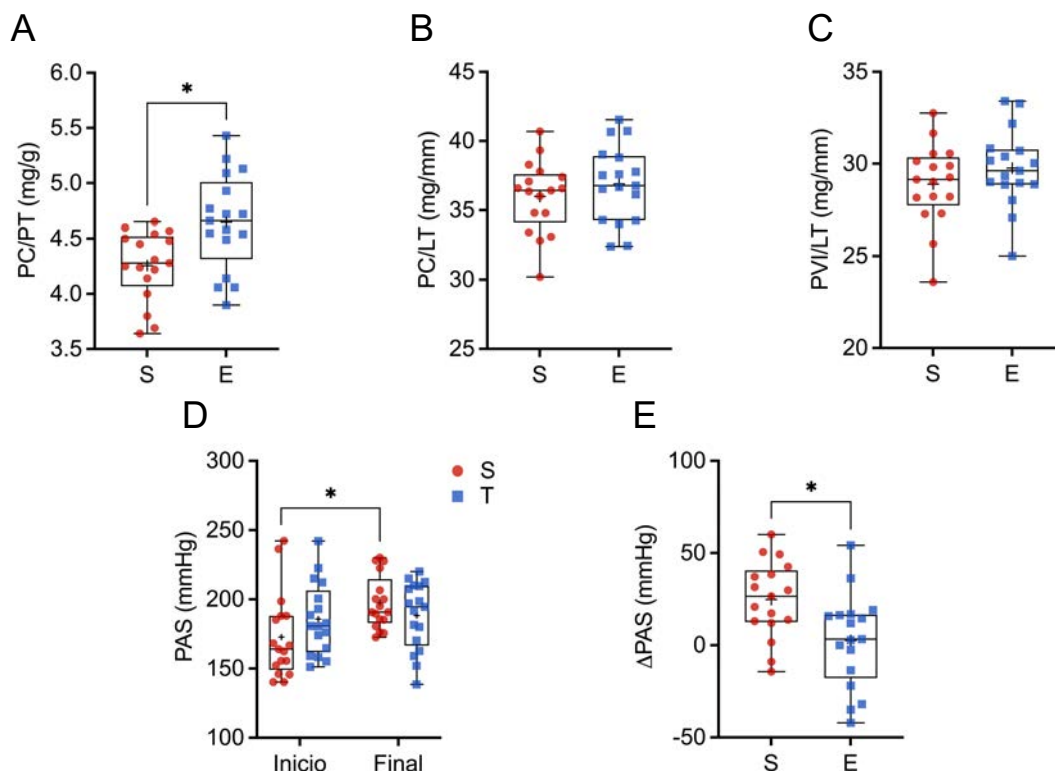


Figura 13. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la masa miocárdica y la presión arterial. Valores morfométricos A) PC/PT: peso del corazón normalizado por peso total, B) PC/LT: peso del corazón normalizado por la longitud de la tibia, C) PVI/LT: peso del ventrículo izquierdo normalizado por la longitud de la tibia. D) Valores de presión arterial sistólica (PAS) y E) diferencia de PAS antes y luego de finalizar el protocolo de entrenamiento. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test o ANOVA de dos vías.

Con el fin de validar el efecto del entrenamiento sobre la masa ventricular y evaluar la función cardíaca se realizaron estudios ecocardiográficos en modo M sobre ambos grupos experimentales. Mediante los datos obtenidos (Tabla 3) se calcularon diversos parámetros ecocardiográficos (Figura 14), como: masa ventricular izquierda (MVI), índice de masa ventricular izquierda (IMVI), porcentaje de acortamiento medioventricular, fracción de eyección, espesor parietal relativo (h/r) y volumen sistólico (VS).

Parámetro	Sinicio	Sfinal	Einicio	Efinal
Diámetro en diástole	6.157 ± 0.157	6.996 ± 0.112	6.156 ± 0.187	6.935 ± 0.557
Diámetro en sístole	2.889 ± 0.187	2.995 ± 0.118	2.901 ± 0.142	2.908 ± 0.072
Septum en diástole	1.901 ± 0.036	1.811 ± 0.021	1.977 ± 0.079	1.871 ± 0.035
Septum en sístole	3.175 ± 0.074	3.502 ± 0.122	3.239 ± 0.102	3.240 ± 0.101
Pared posterior en diástole	2.089 ± 0.086	2.067 ± 0.046	2.137 ± 0.101	2.012 ± 0.063
Pared posterior en sístole	3.532 ± 0.103	3.744 ± 0.095	3.576 ± 0.107	3.545 ± 0.063

Tabla 3. Parámetros ecocardiográficos. Media±SEM (n). S sedentario, E: entrenado, *: p<0.05, t-Test.

Se encontró un mayor aumento en la MVI estimada por ecocardiografía en las ratas S (mg, S_{inicio}: 852.8 ± 46.5 (17), S_{final}: 1012.0 ± 33.3 (17), E_{inicio}: 896.7 ± 60.7 (17), E_{final}: 973.1 ± 32.0 (17)) (Figura 14A), sin embargo, cuando se normalizó por el peso de los animales (IMVI) no hubo cambios entre los grupos (mg/g, S_{inicio}: 3.04 ± 0.20 (17), S_{final}: 3.11 ± 0.12 (17), E_{inicio}: 3.23 ± 0.24 (17), E_{final}: 3.19 ± 0.11 (17)) (Figura 14B). Tampoco se encontraron modificaciones en el ancho promedio de la pared del corazón en diástole (mm, S_{inicio}: 2.00 ± 0.5 (17), S_{final}: 1.98 ± 0.02 (17), E_{inicio}: 2.06 ± 0.08 (17), E_{final}: 1.94 ± 0.04 (17)) (Figura 14C). Por otro lado, luego de las 8 semanas del protocolo experimental el porcentaje de acortamiento medioventricular (% , S_{inicio}: 23.45 ± 1.27 (17), S_{final}: 26.13 ± 1.04 (17), E_{inicio}: 23.16 ± 1.29 (17), E_{final}: 28.98 ± 0.64 (17)) y la fracción de acortamiento endocárdica (% , S_{inicio}: 52.98 ± 2.81 (17), S_{final}: 57.31 ± 1.30 (17), E_{inicio}: 52.88 ± 1.75 (17), E_{final}: 58.08 ± 0.64 (17)) aumentaron en el grupo E, ambos indicadores de la función contráctil (Figura 14D y 14E). Además, se evaluó la geometría de los corazones mediante el h/r (Figura 14F), no encontrándose cambios entre los grupos al inicio ni al finalizar el entrenamiento (S_{inicio}: 0.69 ± 0.04 (17), S_{final}: 0.59 ± 0.01 (17), E_{inicio}: 0.71 ± 0.04 (17), E_{final}: 0.59 ± 0.02 (17)), pero ambos grupos tomaron una geometría más excéntrica -disminución h/r-. Por último y en el mismo sentido del aumento del tamaño de la cámara ventricular, se encontró un aumento

en el volumen sistólico de ambos grupos al final del período experimental, sin diferencias significativas entre ellos (ml, S_{inicio} : 211.1 ± 15.1 (17), S_{final} : 317.6 ± 13.7 (17), E_{inicio} : 216.5 ± 20.2 (17), E_{final} : 314.3 ± 18.2 (17)) (Figura 14G).

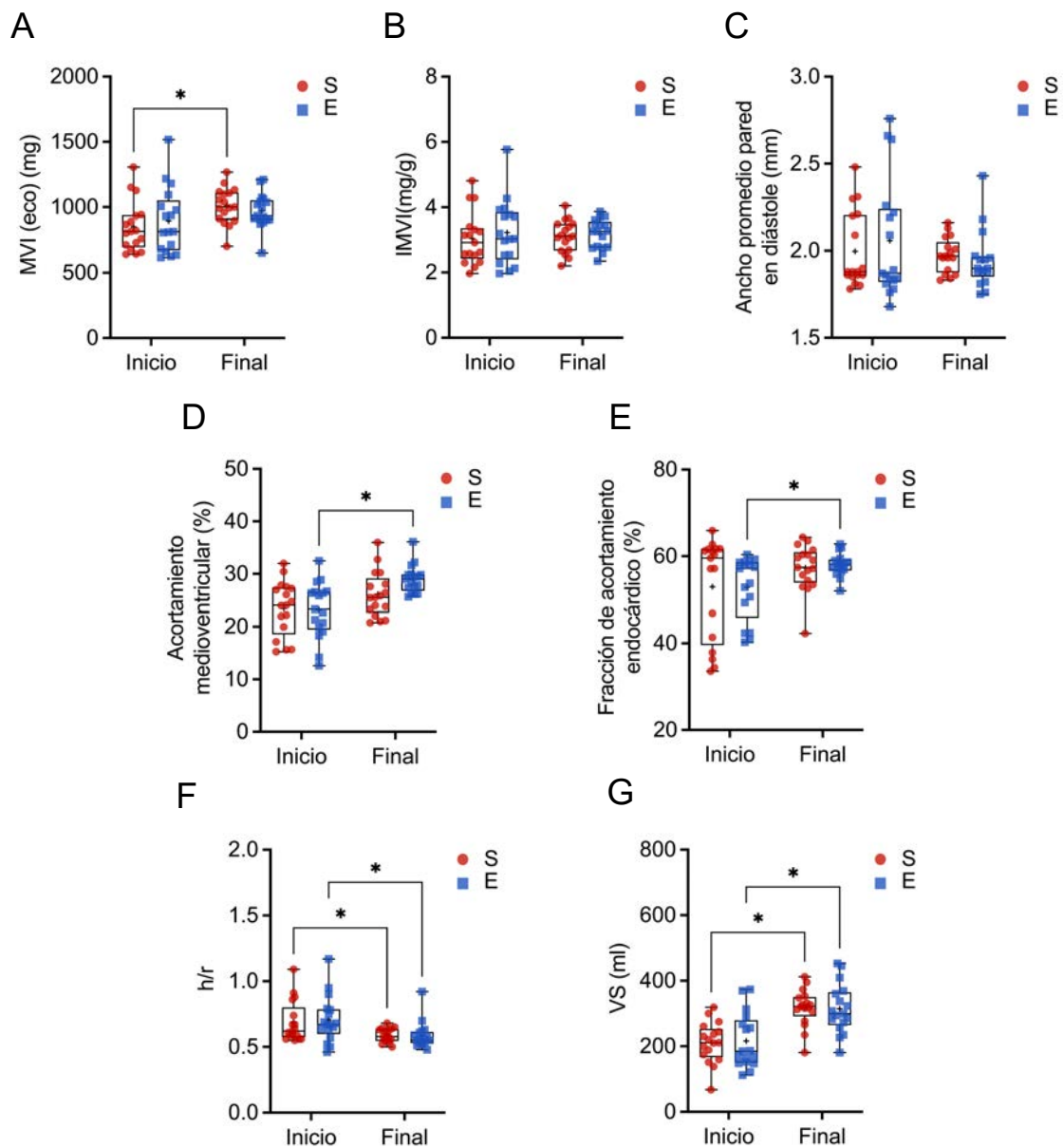
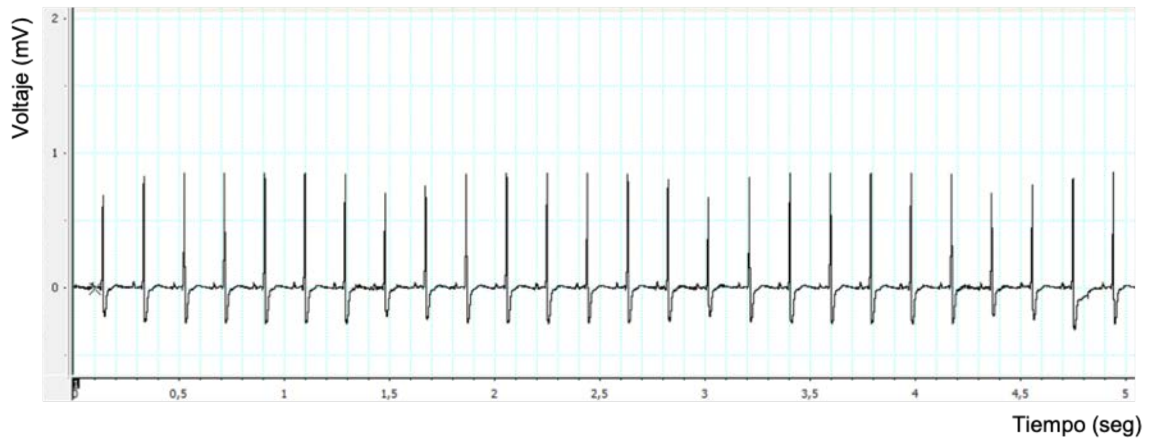


Figura 14. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre parámetros ecocardiográficos. A) masa ventricular izquierda estimada (MVI), B) índice de masa ventricular izquierda (IMVI), C) ancho promedio de las paredes ventriculares en diástole, D) porcentaje de acortamiento medioventricular, E) fracción

de acortamiento endocárdico, F) espesor parietal relativo (h/r) y G) volumen sistólico (VS). S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, ANOVA de dos vías.

Adicionalmente, se realizaron electrocardiogramas (Figura 15) en ambos grupos con el fin de evaluar si el entrenamiento aeróbico tenía algún efecto sobre el automatismo y la conducción eléctrica, detectable con este método. De esta forma se encontraron diferencias significativas en la frecuencia cardiaca (lpm, S_{inicio} : 329.0 ± 14.8 (6), S_{final} : 298.3 ± 10.1 (6), E_{inicio} : 333.9 ± 5.0 (6), E_{final} : 311.5 ± 10.2 (6)) (Figura 16A), la duración de los intervalos RR (ms, S_{inicio} : 173.5 ± 7.4 (6), S_{final} : 202.3 ± 6.9 (6), E_{inicio} : 179.9 ± 2.6 (6), E_{final} : 193.6 ± 6.1 (6)) (Figura 16B) y del intervalo QTc (ms, S_{inicio} : 79.7 ± 4.3 (6), S_{final} : 83.8 ± 0.9 (6), E_{inicio} : 76.3 ± 4.1 (6), E_{final} : 89.6 ± 1.8 (6)) (Figura 16C) entre el inicio y el final del protocolo experimental. Sin embargo, estos valores se ven afectados en gran medida por la anestesia que tienen los animales a la hora del registro y por lo tanto no se consideraron como relevantes. Por otro lado, la amplitud de la onda P (mV, S_{inicio} : 45.8 ± 7.5 (6), S_{final} : 42.3 ± 8.4 (6), E_{inicio} : 40.0 ± 4.6 (6), E_{final} : 48.8 ± 6.7 (6)) (Figura 16D) no se vio modificada por el tiempo ni por el entrenamiento, pero sí la duración (ms, S_{inicio} : 13.7 ± 1.2 (6), S_{final} : 17.9 ± 0.9 (6), E_{inicio} : 11.3 ± 0.3 (6), E_{final} : 14.1 ± 1.4 (6)) (Figura 16E), la cual se vio incrementada en el grupo S y no en el E. Por otro lado, si bien se observó una diferencia entre los grupos en la duración del intervalo PR al inicio del período experimental (ms, S_{inicio} : 61.4 ± 1.9 (6), S_{final} : 62.2 ± 3.7 (6), E_{inicio} : 55.6 ± 0.5 (6), E_{final} : 55.2 ± 2.8 (6)) (Figura 16F), se consideró como un evento aleatorio, ya que fue el único valor de todos los evaluados en los electrocardiogramas que presentó este comportamiento. No se encontraron diferencias significativas en la deflexión intrínseca (ms, S_{inicio} : 13.1 ± 1.1 (6), S_{final} : 13.0 ± 1.2 (6), E_{inicio} : 12.3 ± 0.4 (6), E_{final} : 13.7 ± 0.4 (6)) (Figura 16G), indicando que la activación del miocardio no se ve modificada por el protocolo de entrenamiento. Por último y relacionado con el complejo QRS, el entrenamiento aumentó la amplitud (mV, S_{inicio} : 93.6 ± 14.9 (6), S_{final} : 99.8 ± 14.7 (6), E_{inicio} : 87.4 ± 12.7 (6), E_{final} : 138.5 ± 10.4 (6)) (Figura 16H) y la duración (ms, S_{inicio} : 15.9 ± 1.3 (6), S_{final} : 16.9 ± 1.1 (6), E_{inicio} : 15.1 ± 0.6 (6), E_{final} : 16.8 ± 0.7 (6)) (Figura 16I) del mismo.

A Sedentaria



B Entrenada

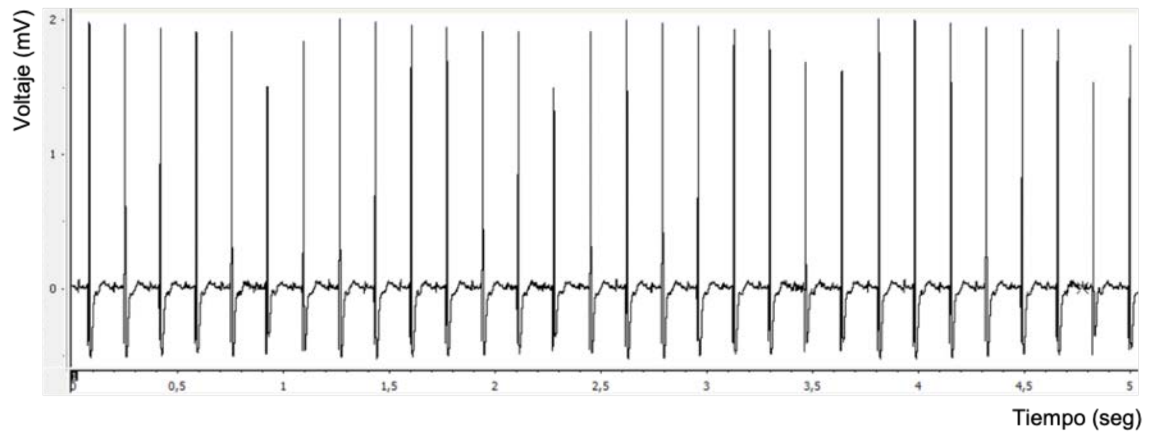


Figura 15. Registros representativos del electrocardiograma. A) Registro electrocardiográfico de una rata sedentaria y B) Ídem de una entrenada.

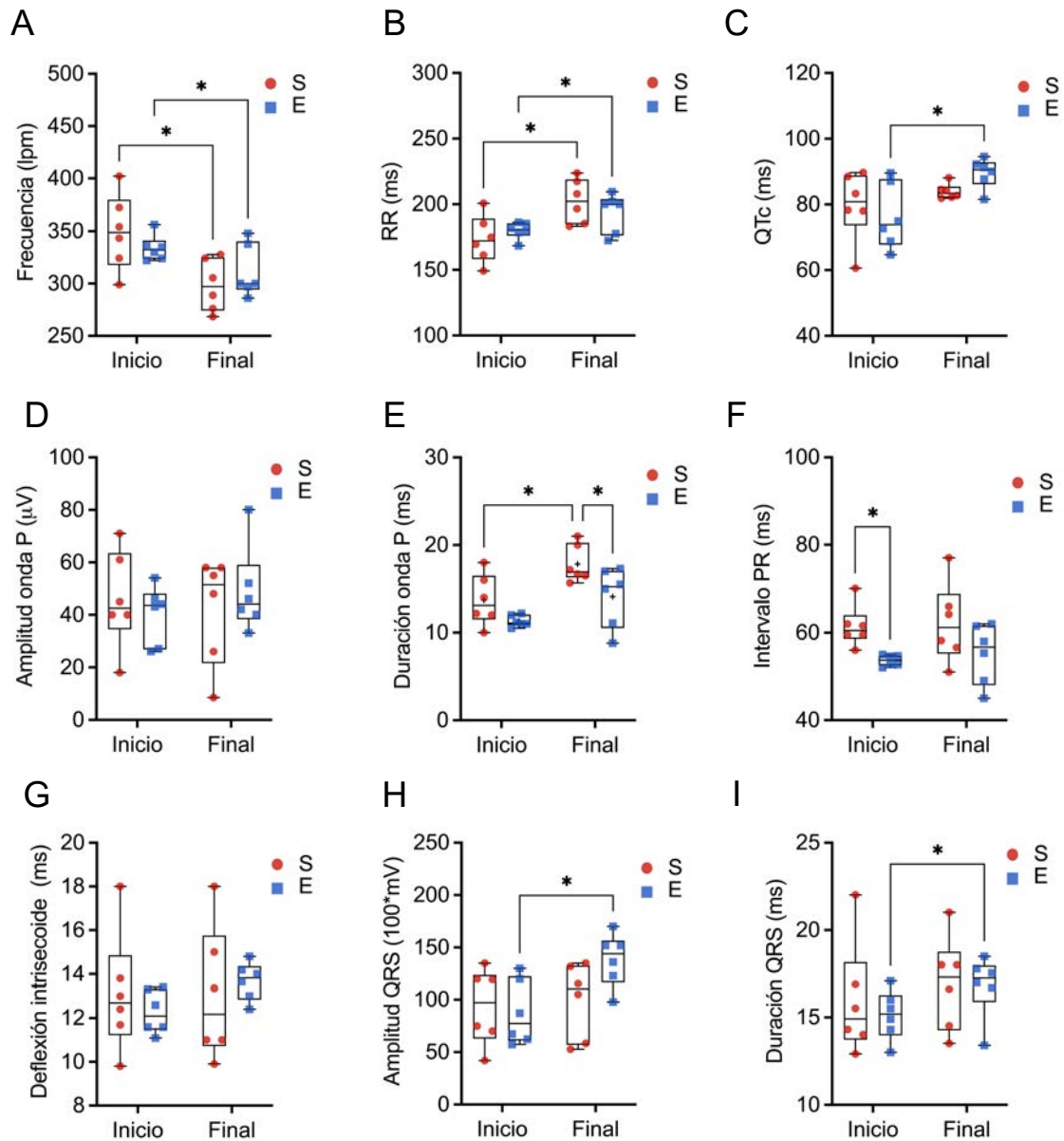


Figura 16. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre parámetros electrocardiográficos. A) frecuencia cardíaca, B) duración del intervalo entre dos ondas R consecutivas (RR), C) duración del intervalo entre onda Q y T corregido por el intervalo RR (QTc), D) amplitud y E) amplitud de la onda P, F) duración del intervalo entre la onda P y R (PR), G) duración de la deflexión intrinsecoide, H) amplitud e I) duración del complejo QRS. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, ANOVA de dos vías.

Considerando estos resultados podemos sostener que el entrenamiento aeróbico mantenido durante 8 semanas es capaz de prevenir el aumento de la presión arterial sistólica ocurrido en el grupo sedentario (Figura 13D y 13E).

También que, si bien la masa relativa del corazón no cambia ([Figura 13B](#) y [13C](#)), ésta se contrae de mejor manera ([Figura 14D](#) y [14E](#)). Además, el entrenamiento fue capaz de evitar la prolongación de la onda P ([Figura 16E](#)), indicando posiblemente una mejoría en la conducción del impulso eléctrico. Por lo tanto, como conclusión parcial de estos resultados, el entrenamiento aeróbico sostenido durante 8 semanas produce una mejora de la función cardíaca, entendida como una mejor contracción a pesar de mantenerse valores de presión arterial elevados y sin modificación de la masa cardíaca.

4.3 Entrenamiento aeróbico y marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca

Habiendo encontrado mejora en la función cardíaca fuimos a evaluar la expresión de algunos marcadores de hipertrofia cardíaca patológica para determinar si se debía a una transformación del fenotipo hipertrófico hacia uno más fisiológico. Primero, evaluamos la expresión relativa de los ARNm de las isoformas 1 (col1a1) y 3 (col3a1) del colágeno. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de col1a1 (%S, S: 100.00 ± 10.46 (8), E: 115.9 ± 25.05 (5)) ni col3a1 (%S, S: 100.00 ± 7.38 (8), E: 130.0 ± 23.43 (5)) entre los grupos experimentales ([Figura 17A](#) y [17B](#)). Además, se calculó la relación entre las dos isoformas -col1a1/col3a1- sin encontraron diferencias significativas (%S, S: 100.00 ± 15.13 (8), E: 82.86 ± 8.77 (5)) ([Figura 17C](#)). Posteriormente, se midió la expresión de dos proteínas que modifican la matriz extracelular, estas son la metaloproteasa-2 de la matriz y el factor de crecimiento de tejido conectivo, MMP2 y CTGF, respectivamente. En el miocardio de las ratas E la expresión tanto de MMP2 (%S, S: 100.00 ± 6.72 (9), E: 77.17 ± 4.85 (9)) como de CTGF (%S, S: 100.00 ± 13.42 (8), E: 66.76 ± 5.98 (8)) disminuyeron significativamente ([Figura 17D](#) y [17E](#)). Por último, se midió la expresión miocárdica de dos marcadores asociados con hipertrofia cardíaca patológica: el péptido natriurético auricular y la isoforma β de la cadena pesada de miosina, ANP y β -MHC respectivamente. El entrenamiento redujo significativamente los niveles de expresión

de ANP (%S, S: 100.00 ± 22.70 (9), E: 20.94 ± 6.14 (10)) y produjo una leve tendencia a reducir los niveles de β -MHC (%S, S: 100.00 ± 12.84 (7), E: 74.85 ± 9.02 (6), $p=0.15$) (Figura 17F y 17G).

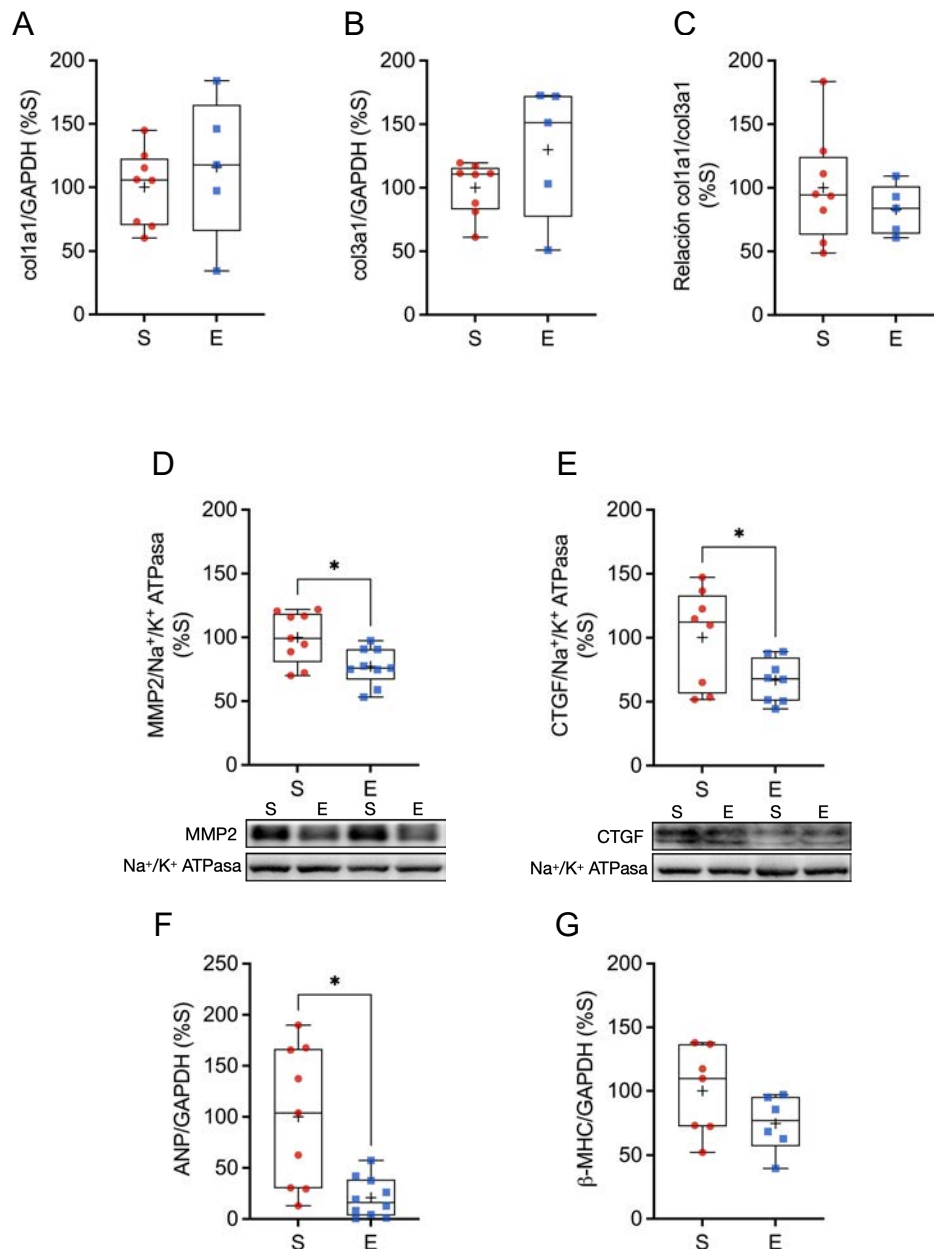


Figura 17. Efectos del entrenamiento sobre los marcadores de hipertrofia cardíaca patológica. Expresión relativa del ARNm de A) colágeno 1 (col1), B) colágeno 3 (col3) y C) la relación entre ambos (col1/col3). Expresión proteica relativa de D) la metaloproteasa-2 de matriz (MMP2) y E) el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). Expresión relativa del ARNm de F) péptido natriurético auricular (ANP) y la isoforma β de la cadena pesada de la miosina (β -MHC). S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test.

Estos resultados sugieren que el entrenamiento aeróbico estaría oponiéndose a la hipertrofia cardíaca patológica por la disminución en los niveles de ANP y la tendencia de disminuir de β -MHC ([Figura 17D](#) y [17E](#)). Estos cambios no son de reversión de la hipertrofia, si no probablemente de la conversión de fenotipo, evidenciado por la disminución de la expresión de MMP2 y CTGF ([Figura 17F](#) y [17G](#)) sin cambios en la masa miocárdica ([Figura 13B](#)).

4.4 Entrenamiento aeróbico y ultraestructura miocárdica

Con el objeto de evaluar si el entrenamiento indujo cambios ultraestructurales en el miocardio hipertensivo que complementen y refuercen los resultados de la sección anterior se realizaron cortes longitudinales de ventrículo izquierdo en ambos grupos para su observación por MET ([Figura 18A](#)). Una vez obtenidas las imágenes se cuantificaron los siguientes parámetros morfológicos en las mitocondrias interfibrilares: área de sección transversal (S: 0.79 (0.57-0.93) (7), E: 0.88 (0.75-1.02) (7)), diámetro de Feret (S: 1.29 (1.10-1.36) (7), E: 1.43 (1.31-1.55) (7)), relación de aspecto (S: 1.53 (1.50-1.64) (7), E: 1.74 (1.54-1.95) (7)) y circularidad (S: 0.87 (0.86-0.87) (7), E: 0.83 (0.77-0.88) (7)); así como la longitud de los sarcómeros (S: 1.67 (1.32-1.79) (7), E: 1.81 (1.64-2.22) (7)) ([Figura 18B](#)). No se encontraron diferencias significativas en la mayoría de estas variables. Sin embargo, la relación de aspecto fue mayor en el grupo E comparado al grupo S, sugiriendo que las mitocondrias del miocardio hipertrófico de las ratas entrenadas son más ovaladas. Además, se cuantificó el porcentaje de área que ocupaban las mitocondrias (S: 24.0 (21.7-25.0) (7), E: 21.6 (21.2-24.4) (7)) ([Figura 18C](#)), la densidad mitocondrial (S: 26.9 (26.5-28.0) (7), E: 22.1 (20.6-25.9) (7)) ([Figura 18D](#)) y la relación entre el diámetro de Feret y la longitud del sarcómero (S: 0.80 (0.76-0.83) (7), E: 0.78 (0.71-0.84) (7)) ([Figura 18E](#)) no encontrando diferencias en ninguno de estos parámetros entre ambos grupos experimentales.

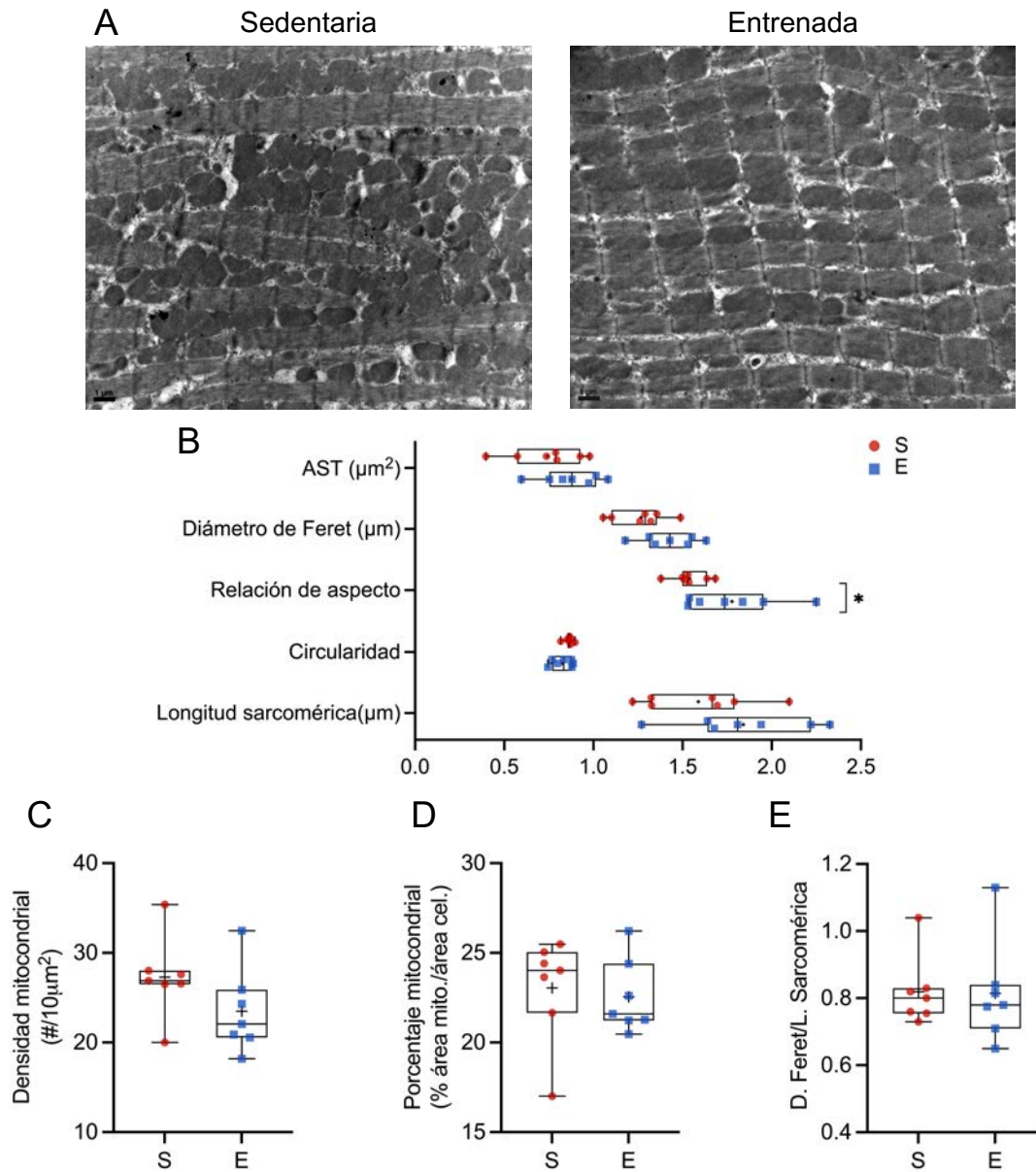


Figura 18. Morfometría de las mitocondrias miocárdicas. A) Imágenes representativas de MET $\times 10k$ barra de escala = $1 \mu m$. B) Cuantificación de parámetros morfológicos: área de sección transversal (AST), diámetro de Feret, relación de aspecto, circularidad y longitud sarcomérica C) densidad mitocondrial, D) porcentaje de área mitocondrial y E) relación entre diámetro de Feret y longitud del sarcómero. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, Mann-Whitney.

A su vez, en las imágenes de MET se observó que en los cortes de miocardio provenientes del grupo S había un desarreglo ultraestructural. Puntualmente, dentro de ese desarreglo sobresalen: interrupciones de los haces de sarcómeros, acúmulos

o *clusters* de mitocondrias interfibrilares y pérdida del entramado sarcómero/mitocondria. Mientras que en los cortes del grupo E parecía que este desarreglo ultraestructural se revertía. Con la intención de cuantificar el efecto sobre el desarreglo observado se utilizaron tres herramientas diferentes de análisis de imágenes. La primera, mediante la segmentación de las imágenes se cuantificó la cantidad de mitocondrias vecinas entre sí y se utilizó como punto de corte y parámetro de vecindad a la mediana de la distancia del vecino más cercano (S: 1.00 (0.91-1.23) (7), E: 1.19 (1.17-1.24) (7)) ([Figura 19A](#)), no detectando modificaciones significativas como consecuencia del entrenamiento aeróbico. La cantidad de mitocondrias vecinas que presentaba cada mitocondria se redujo a causa del protocolo de entrenamiento (S: 2.76 (2.50-3.09) (7), E: 1.93 (1.87-2.6) (7)) ([Figura 19B](#)). La segunda herramienta utilizada consistió en el uso del Plug-in SSIDC Clusters, de BioVoxel en FIJI, para determinar la cantidad de *clusters* mitocondriales por campo. De forma análoga a la otra herramienta, se utilizó el mismo punto de corte para determinar la vecindad entre dos mitocondrias y se consideró como *cluster* a los agrupamientos conformados por una mitocondria con 4 o más vecinas. De forma similar -aunque sin alcanzar significación estadística-, la cantidad de acúmulos/*clusters* mitocondriales por campo tendió a ser más bajo en el grupo E respecto al S (3: (S: 13.75 (12.50-14.00) (7), E: 12.80 (11.25-15.50) (7)), 4: (S: 11.00 (10.20-12.25) (7), E: 10.00 (8.67-13.75) (7)), 5: (S: 8.80 (7.33-10.20) (7), E: 7.40 (7.25-10.60) (7)) y 6: (S: 7.00 (5.80-8.50) (7), E: 6.20 (5.00-8.40) (7))) ([Figura 19C](#)). Finalmente, como última estrategia, se utilizó la cuantificación de la entropía global de Shannon -como parámetro de uniformidad/aleatoriedad de la distribución de mitocondrias por campo- en función de la cantidad de cuadrantes por campo. El entrenamiento promovió un patrón más uniforme en la distribución de las mitocondrias miocárdicas (9: (S: 0.949 (0.929-0.965) (6), E: 0.969 (0.962-0.975) (6)); 16: (S: 0.939 (0.919-0.955) (6), E: 0.956 (0.951-0.964) (6)) (p=0.06) ([Figura 19D](#)).

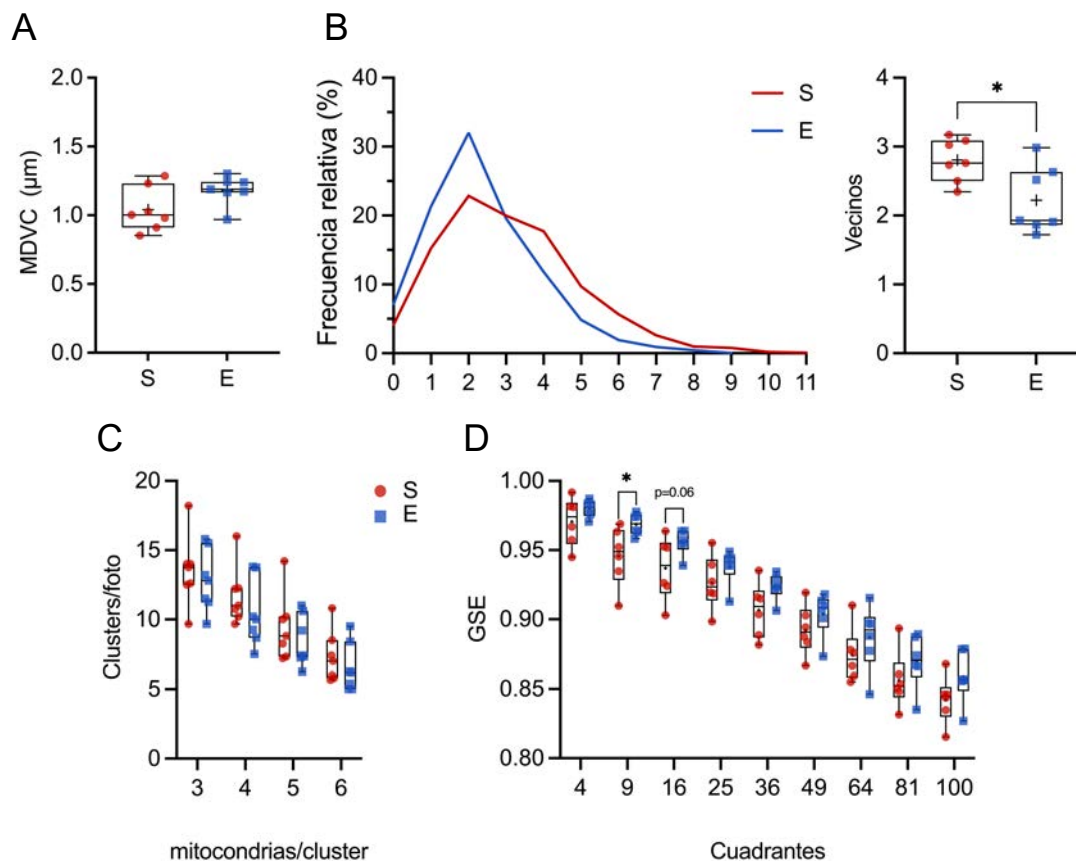


Figura 19. Cambios en el ordenamiento mitocondrial. A) Mediana de la distancia al vecino más cercano (MDVC). B) Frecuencia relativa y mediana de la cantidad de vecinos por mitocondria. C) Cantidad de clusters mitocondriales por campo en función del tamaño de estos. D) Entropía global de Shannon (GSE) en función de los cuadrantes de análisis. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, Mann-Whitney.

Estos resultados indican que el entrenamiento aeróbico de natación realizado durante 8 semanas no produjo modificaciones significativas en la ultraestructura de las mitocondrias miocárdicas -solo observándose mitocondrias más ovaladas ([Figura 18B](#))-. Sin embargo, e interesantemente, sí tuvo un impacto significativo sobre el desarreglo de la red mitocondria/sarcómero presente en los cardiomiocitos de las ratas S, reduciendo el número de mitocondrias vecinas ([Figura 19B](#)), sin cambiar la distancia entre ellas ([Figura 19A](#)) y favoreciendo que el patrón de distribución mitocondrial en el cardiomiocito sea más uniforme ([Figura 19D](#)). Esto sugiere que las unidades energéticas intracelulares de las ratas E tienen una

conformación más eficiente, en la cual el ATP producido por una mitocondria funcional puede difundir más eficientemente hasta el sarcómero facilitando así la contracción del miocardio.

4.5 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la dinámica mitocondrial

Luego de haber demostrado que el entrenamiento modificó el arreglo estructural mitocondria/sarcómero del miocardio, nos interesó determinar si esto podía ser consecuencia de cambios en la dinámica mitocondrial. Para esto se realizaron extracciones de ARN total de ventrículo izquierdo y se cuantificó la expresión de los principales genes involucrados en las distintas fases de la dinámica mitocondrial. De esta manera, determinamos que el entrenamiento aeróbico produjo un aumento en la expresión de los siguientes genes: PGC1- α (% S: 100.0 ± 4.3 (6), E: 155.6 ± 19.8 (6)), DRP-1 (% S: 100.0 ± 5.2 (6), E: 300.7 ± 41.5 (6)) y PINK1 (% S: 100.0 ± 13.7 (6), E: 285.2 ± 39.7 (6)), correspondientes a biogénesis mitocondrial, fisión y mitofagia, respectivamente; así como una disminución de la expresión del gen MFN1 (% S: 100.0 ± 13.1 (5), E: 60.6 ± 9.5 (6)) involucrado en la fusión mitocondrial ([Figura 20A](#)).

Además, para verificar si el aumento de PGC1- α se traduciría en un aumento de la cantidad de mitocondrias se realizaron extracciones de ADN total de ventrículo izquierdo. Se estimó la densidad mitocondrial relativa, como la relación de ADN mitocondrial vs. ADN nuclear (ADNmt/ADNn), y se encontró que esta aumentó en las ratas E respecto al grupo S (% S: 100.00 ± 5.46 (12), E: 138.40 ± 11.87 (14)) ([Figura 20B](#)).

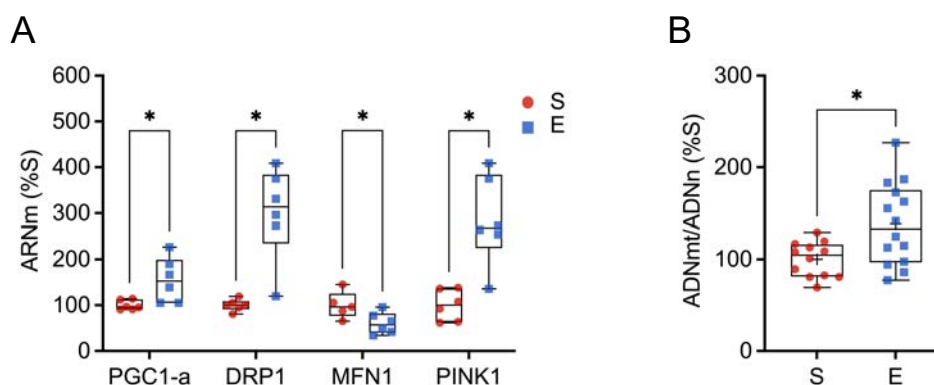


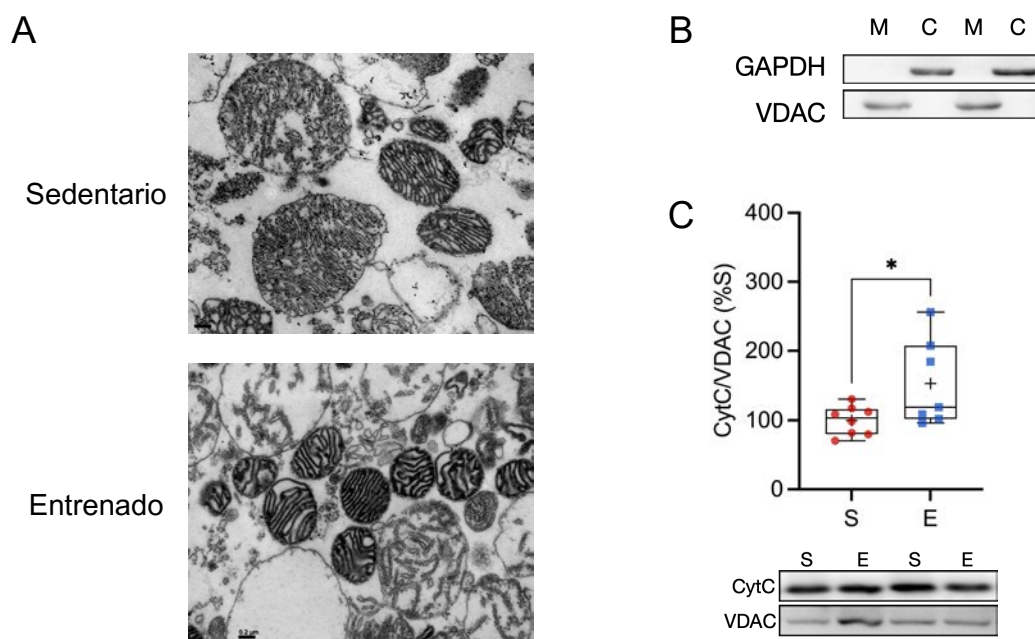
Figura 20. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la dinámica mitocondrial. A) expresión relativa de ARNm de los principales marcadores: PGC1- α , DRP1, MFN1 y PINK, como biogénesis, fisión, fusión y mitofagia, respectivamente; y B) cuantificación de la cantidad de copias de ADN mitocondrial normalizado por las copias de ADN nuclear (ADNmt/ADNn). S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, Welch's test.

Estos resultados sugieren que el entrenamiento es capaz de promover un mecanismo de recambio mitocondrial, estimulando la formación de mitocondrias nuevas y la división y posterior degradación de mitocondrias disfuncionales, junto con la disminución de la fusión de las mitocondrias presentes en el miocardio hipertensivo (Figura 20A). Esto podría ayudar a explicar los resultados del ordenamiento y favorece la hipótesis de las unidades energéticas intracelulares más eficientes. Además, el entrenamiento parece haber inducido un aumento en la masa mitocondrial en el miocardio hipertensivo (Figura 20B), lo que podría contribuir a la mejora de la función cardíaca.

4.6 Efectos del entrenamiento aeróbico en la integridad y función mitocondrial

Sabiendo que la población mitocondrial estaba siendo modificada por los cambios inducidos en la dinámica se decidió evaluar si la función de esta nueva

población -resultado del entrenamiento- era mejor. Para ello, en primer lugar, se evaluó la integridad de las mitocondrias aisladas por MET ([Figura 21A](#)); así como la pureza del aislamiento ([Figura 21B](#)) por inmunoblot, para luego realizar los estudios de función mitocondrial. Además, se estimó la integridad mitocondrial como la cantidad de CytC en la fracción mitocondrial mediante inmunoblot, obteniendo una mayor cantidad de esta proteína en las ratas E en comparación con el grupo S (% S: 100.00 ± 7.41 (8), E: 153.40 ± 23.66 (7)) ([Figura 21C](#)).



*Figura 21. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la integridad mitocondrial. A) micrografía representativa de mitocondrias aisladas de ambos grupos experimentales, B) inmunoblot de fracciones mitocondrial (M) y citosólica (C) con marcadores específicos para cada uno VDAC y GAPDH, respectivamente; y C) cuantificación e inmunoblot de la expresión de Citocromo C (CytC) en las fracciones mitocondriales. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test.*

En segundo lugar, se evaluó la función de las mitocondrias miocárdicas de ambos grupos experimentales. Se determinó la actividad de la enzima mitocondrial CS en el miocardio. Como ya mencionamos, esta enzima forma parte del ciclo de Krebs y por lo tanto juega un rol crucial en la producción energética²²⁰. El protocolo de entrenamiento no produjo cambios significativos en la expresión de esta enzima (% S: 100.00 ± 10.50 (10), E: 102.0 ± 9.80 (10)) ([Figura 22A](#)), pero interesantemente,

generó un aumento de su actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, S: 0.638 ± 0.044 (6), E: 0.870 ± 0.032 (5)) (Figura 22C).

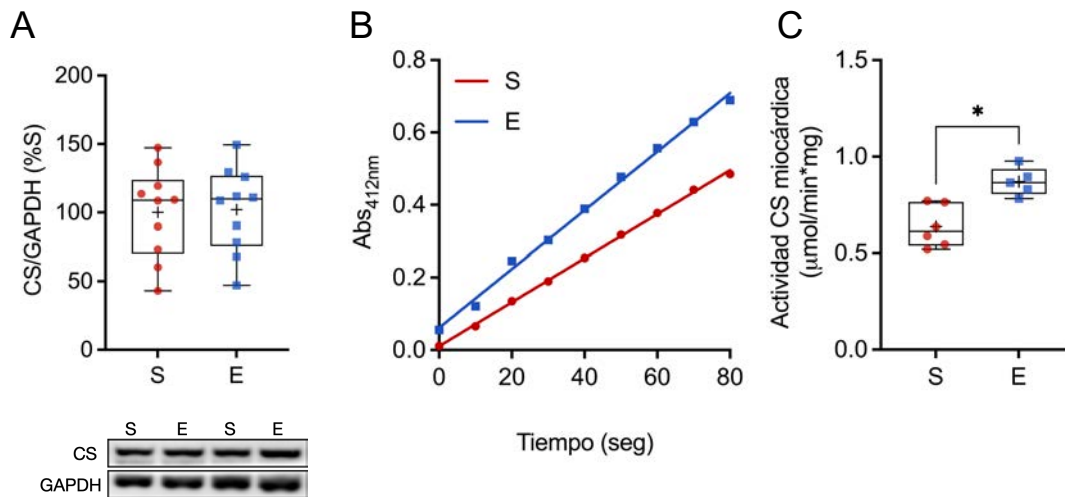


Figura 22. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la enzima citrato sintasa (CS). A) Expresión relativa normalizada por GAPDH y B) gráficos representativos de la actividad enzimática y C) la cuantificación global. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test.

Para seguir corroborando la mejora de la función mitocondrial, se realizó una batería de experimentos destinados a determinar si las mitocondrias del grupo E eran más funcionales y oxidativas. Primero, se estimó el $\Delta\Psi_m$ mediante la ecuación de Nernst-Guggenheim y se detectó un aumento significativo del mismo en el grupo E (mV, S: -157.60 ± 9.25 (5), E: -183.60 ± 2.91 (5)) (Figura 23A). Segundo, se estimó el pH de la matriz mitocondrial y la velocidad de acidificación de esta, mediante la exposición de las mitocondrias a un pH de 6.8 (Figura 23B). En las mitocondrias obtenidas de los corazones de ratas entrenadas el pH de la matriz fue más alcalino (pH, S: 7.11 ± 0.03 (6), E: 7.35 ± 0.04 (6)) (Figura 23C) y su acidificación más rápida (pH/seg, S: 0.022 ± 0.010 (6), E: 0.050 ± 0.007 (6)) (Figura 23D).

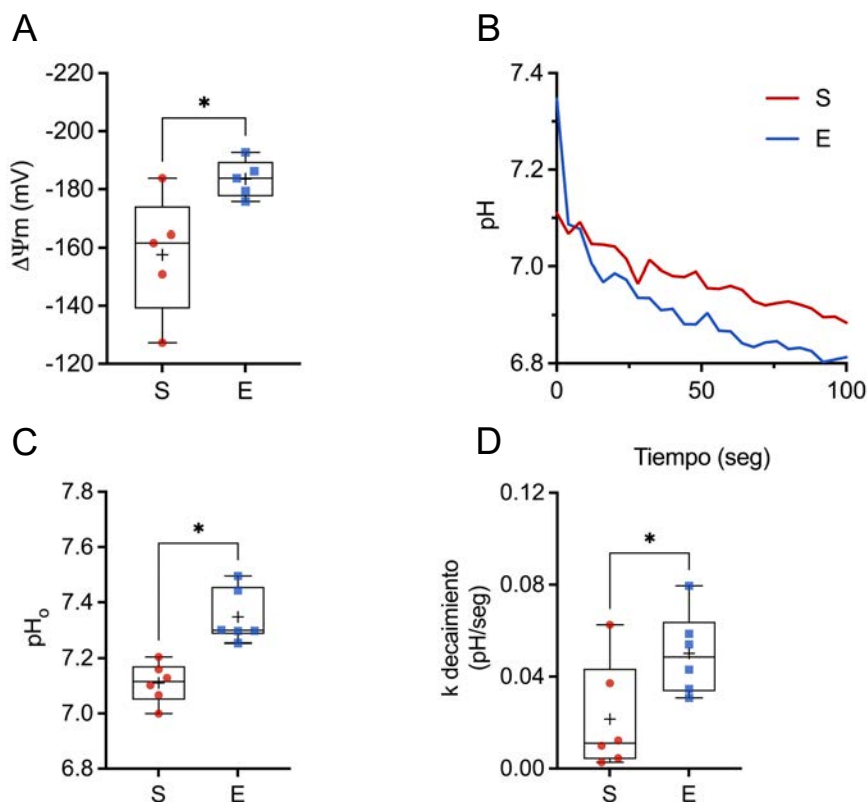


Figura 23. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre los componentes de la fuerza protón motriz. A) potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), B) gráficos representativos de la acidificación de la matriz mitocondrial, C) estimación del pH inicial (pH_o) y D) velocidad (k) de acidificación. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test.

Tercero, se cuantificó la tasa de consumo de O_2 (OCR) mitocondrial en estado 3 y 4, es decir, en presencia de sustratos de la CTE y en presencia/ausencia de ADP, respectivamente. No se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos ($ng-at\ O/min \cdot mg$, $S_{Estado\ 3}$: 173.12 ± 12.72 (5), $S_{Estado\ 4}$: 38.55 ± 2.15 (5), $E_{Estado\ 3}$: 153.46 ± 17.59 (5), $E_{Estado\ 4}$: 36.13 ± 3.96 (5)) (Figura 24A). Sin embargo, cuando se calculó el coeficiente respiratorio (OCR_{E3}/OCR_{E4}) se encontró una tendencia a disminuir en el grupo E -es decir que las ratas entrenadas parecen consumir menos O_2 en presencia de sustratos, para la producción de ATP (s/u, S: 4.69 ± 0.12 (5), E: 4.24 ± 0.17 (5), $p=0.068$) (Figura 24B). Esto podría indicar al menos dos posibilidades: que las mitocondrias del grupo E consumen menos O_2 porque 1) producen menos ATP o 2) están mejor acopladas y son más eficientes en la producción de ATP.

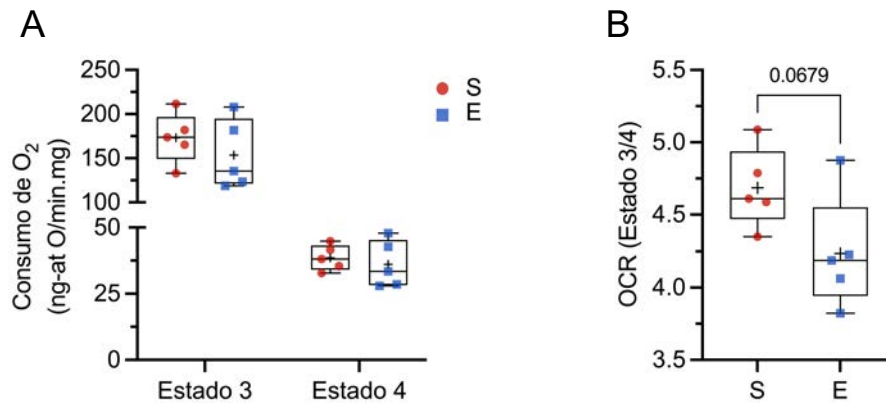


Figura 24. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el consumo de O_2 . A) Consumo de O_2 en estado 3 (con sustratos) y 4 (sin sustratos) y B) relación de consumo de O_2 (OCR). S: sedentario, E: entrenado, estadística ANOVA de dos vías y, *t*-Test, respectivamente.

Por lo tanto, como cuarto punto, se determinó, mediante quimioluminiscencia, el contenido y la producción de ATP en mitocondrias aisladas de corazones de ambos grupos experimentales. Las mitocondrias de las ratas E tuvieron un mayor contenido de ATP (%; S: 100.0 ± 5.5 (11), E: 131.1 ± 9.1 (11)) (Figura 25A) y una velocidad de producción aumentada respecto al grupo S (luminiscencia/seg* μ g, S: 0.073 ± 0.011 (8), E: 0.123 ± 0.020 (8)) (Figura 25B).

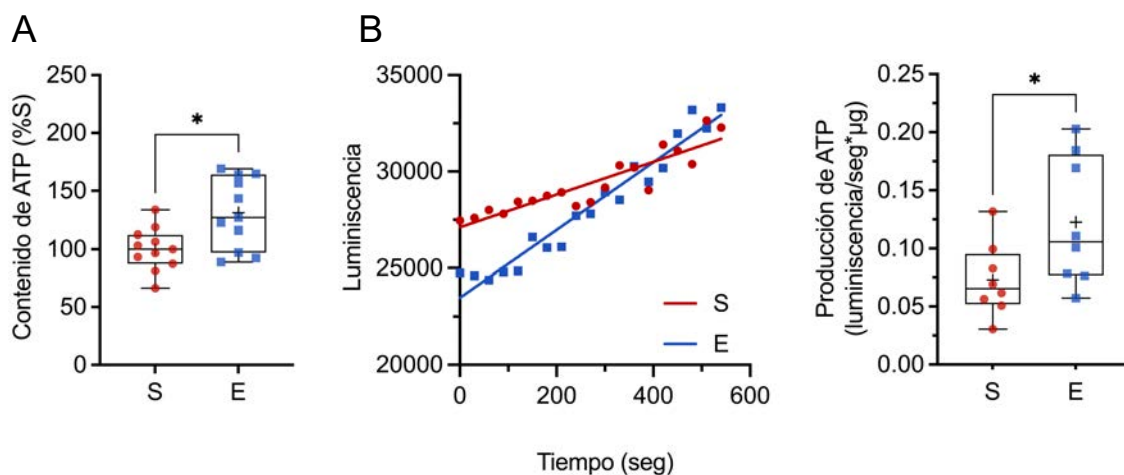


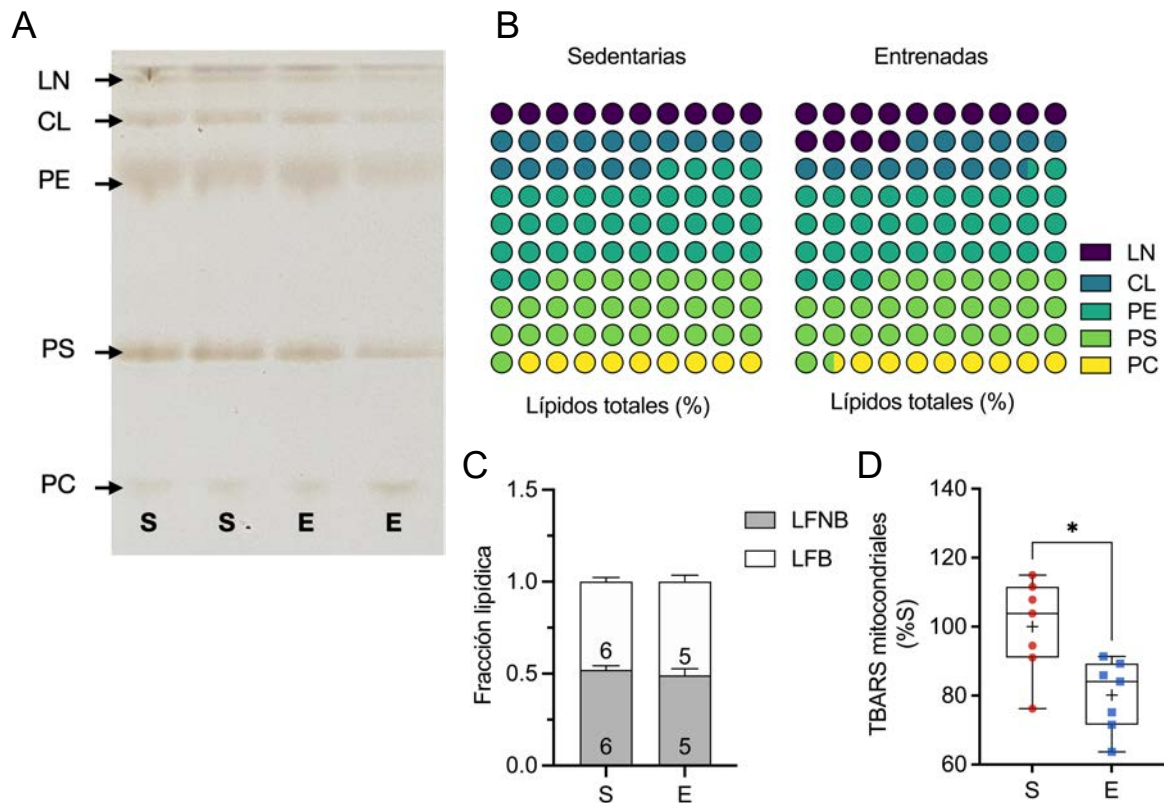
Figura 25. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el contenido y producción de ATP. A) contenido de ATP B) gráfico representativo de la producción de ATP y la velocidad de esta. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, *t*-Test.

El conjunto de estos resultados indica que el entrenamiento aeróbico durante 8 semanas mejora la integridad mitocondrial reflejada por el mayor contenido de CytC en la fracción mitocondrial ([Figura 21C](#)). Además, mejora la función mitocondrial al evidenciar un aumento de la actividad de la enzima citrato sintasa ([Figura 22C](#)), una mayor FPM (mejor $\Delta\Psi_m$ y ΔpH) ([Figura 23A y 23C](#)) y un aumento tanto en el contenido como en la velocidad de producción de ATP ([Figura 25](#)).

4.7 Efecto del entrenamiento aeróbico sobre los lípidos mitocondriales

Teniendo en cuenta que las mitocondrias de las ratas entrenadas resultaron ser más funcionales y oxidativas, se prosiguió en la búsqueda de posibles partícipes involucrados en las adaptaciones que evidenciamos. Entre ellos, surgió la CL, fosfolípido mitocondrial que regula en gran medida la función de la organela al modificar las propiedades de las membranas mitocondriales y, por lo tanto, la estabilidad de la CTE, tal como ya fue descrito en la introducción de esta tesis doctoral. A fin de evaluar su participación se midió mediante cromatografía de capa fina de alta performance el contenido de CL y otras familias lipídicas en mitocondrias aisladas de corazones de ambos grupos experimentales ([Figura 26A](#)). La técnica empleada permite resolver las diversas clases de fosfolípidos presentes de forma dependiente de la mezcla de solventes utilizada. Así, se evaluaron las fracciones de lípidos formadores de bicapas (LFB) y de lípidos no formadores de bicapas (LNFB) en las mitocondrias aisladas, no obteniendo diferencias entre ambos grupos experimentales (s/u, LNFB: S: 0.52 ± 0.02 (6), E: 0.48 ± 0.02 (5); LFB: S: 0.49 ± 0.04 (6), E: 0.51 ± 0.04 (5)) ([Figura 26C](#)). El entrenamiento tampoco modificó la cantidad relativa de ninguna de las clases de los fosfolípidos presentes en las mitocondrias de ambos grupos experimentales (%), LN: S: 10.2 ± 1.9 (6), E: 13.9 ± 1.8 (5); CL: S: 15.8 ± 1.0 (6), E: 14.6 ± 1.0 (5); PE: S: 36.2 ± 1.5 (6), E: 34.5 ± 2.7 (5); PS: S: 28.8 ± 2.1 (6), E: 28.5 ± 0.8 (5); PC: S: 9.0 ± 2.1 (6), E: 8.5 ± 2.1 (5)) ([Figura 26B](#)). Por otro lado,

para complementar el estudio lipídico se midió el estado de oxidación de los lípidos totales de las mitocondrias aisladas mediante la cuantificación de TBARS, encontrándose una menor peroxidación lipídica en las muestras provenientes de las ratas E (% S: 100.00 ± 5.14 (7), E: 80.16 ± 3.87 (7)) ([Figura 26D](#)).



*Figura 26. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre los lípidos mitocondriales. A) imagen representativa de cromatografía en capa fina de alta performance (HP-TLC) B) cuantificación de las distintas especies lipídicas (LN: lípidos neutros, CL: cardiolípidina, PE: fosfatidiletanolamina, PS: fosfatidilserina y PC: fosfatidilcolina), C) cuantificación de lípidos formadores y no formadores de bicapas (LFB y LNFB, respectivamente), D) peroxidación lipídica mitocondrial. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test.*

Estos resultados demuestran que las composiciones mitocondriales lipídicas entre los grupos son similares ([Figura 26B](#)). Sin embargo, los lípidos presentes en las mitocondrias de las ratas E presentan menos daño oxidativo ([Figura 26D](#)), indicando que la mejora en la función mitocondrial no está vinculada con las cantidades relativas de los lípidos. Sin embargo, la diferencia

observada en la peroxidación lipídica podría indicar que esta es al menos un factor que contribuye al desarrollo de hipertrofia patológica o la consecuencia del desbalance del estado redox.

4.8 Entrenamiento aeróbico y manejo de Ca^{2+} mitocondrial

Otro potencial causante de las mejoras mitocondriales podría ser el Ca^{2+} , el cual tiene un flujo hacia dentro y fuera de la mitocondria altamente regulado. Como se mencionó en la introducción, un aumento de la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial produce la estimulación de la actividad de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, generando así un aumento en la cantidad de NADH y FADH_2 y, por ende, en la producción de energía. Sin embargo, hay que recordar que el aumento del Ca^{2+} también ha sido descrito como responsable de estimular la apertura del mPTP y, por ende, potencialmente perjudicial para el destino mitocondrial y celular.

Debido a que la homeostasis mitocondrial se puede ver comprometida ante mayores aperturas o aperturas prolongadas del mPTP, se decidió estudiarlo utilizando la maniobra del pulso de Ca^{2+} que produce el hinchamiento de la matriz mitocondrial ([Figura 27A](#)). Utilizando esta maniobra experimental, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ante agregados secuenciales de 0, 20, 50, 100, 200 y 2000 μM de Ca^{2+} (Δ_{Abs} , S_0 : -0.013 ± 0.002 (10), E_0 : -0.019 ± 0.004 (11), S_{20} : -0.123 ± 0.019 (6), E_{20} : -0.108 ± 0.018 (6), S_{50} : -0.101 ± 0.018 (4), E_{50} : -0.117 ± 0.006 (5), S_{100} : -0.120 ± 0.014 (4), E_{100} : -0.156 ± 0.012 (5), S_{200} : -0.197 ± 0.020 (10), E_{200} : -0.210 ± 0.014 (11), S_{2000} : -0.237 ± 0.028 (9), E_{2000} : -0.203 ± 0.013 (9)) ([Figura 27B](#)).

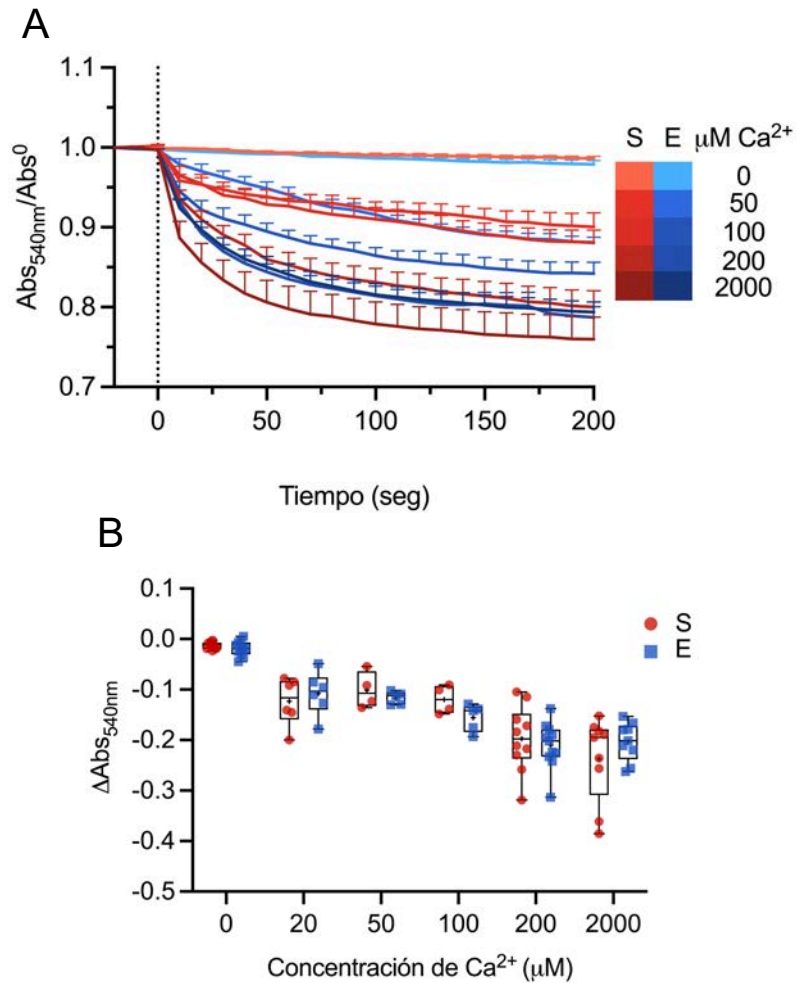


Figura 27. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el hinchamiento de la matriz mitocondrial. A) Curvas promedio de la caída en la absorbancia a 540 luego del agregado del pulso de Ca^{2+} (línea punteada), B) Cuantificación de la diferencia de absorbancia antes y después del pulso. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, ANOVA de dos vías.

Luego, se midió la capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC) y tampoco se encontraron diferencias significativas entre las ratas S y E ($\mu M/mg$, S: 168.5 ± 22.9 (9), E: 162.4 ± 21.7 (10)) (Figura 28A). Por último, se cuantificó el contenido de Ca^{2+} mitocondrial (CCM) no encontrándose diferencias entre los grupos experimentales (nmol/mg, S: 58.91 ± 14.87 (7), E: 80.86 ± 18.56 (10)) (Figura 28B).

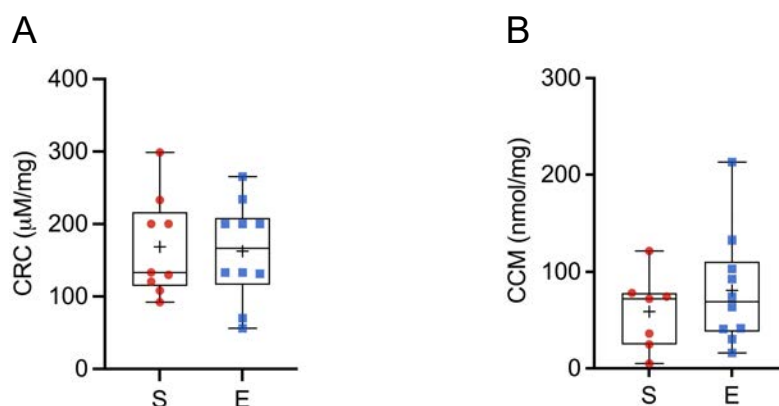


Figura 28. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la capacidad de retención y contenido de Ca^{2+} mitocondrial. A) capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC), B) estimación del contenido de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test.

Estos resultados indican que el entrenamiento aeróbico no produjo modificaciones en la probabilidad de apertura inducida por Ca^{2+} del mPTP, ni en la capacidad de retención y el contenido de la matriz mitocondrial de este ion (Figura 27 y 28); alejándolos así, al menos por el momento, de la lista de posibles responsables de la mejora del fenotipo mitocondrial.

4.9 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre los niveles de O-Gluco-N-Acetilación mitocondriales

Dentro de las posibles modificaciones que tienen efecto sobre la función mitocondrial están las O-GlcNAc, las que dependen de dos enzimas que transfieren o hidrolizan este grupo químico de los residuos Ser y Thr de las proteínas, y también de la utilización de distintos tipos nutrientes por parte de la célula. Se midieron los niveles de O-GlcNAc en la fracción mitocondrial, obteniéndose una reducción significativa en el grupo E (% S: 100.00 ± 10.51 (10), E: 73.76 ± 6.54 (10)) (Figura 29A). Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles de expresión de las dos enzimas que catalizan la transferencia o la hidrólisis de este grupo O-GlcNAc transferasa (OGT) (% S: 100.00 ± 17.07 (4), E: 71.87 ± 5.71 (4), $p = 0.17$) y O-GlcNAc

acetilasa (OGA) (% S: 100.00 ± 15.78 (5), E: 95.43 ± 14.53 (5)) respectivamente (Figura 29B y 29C).

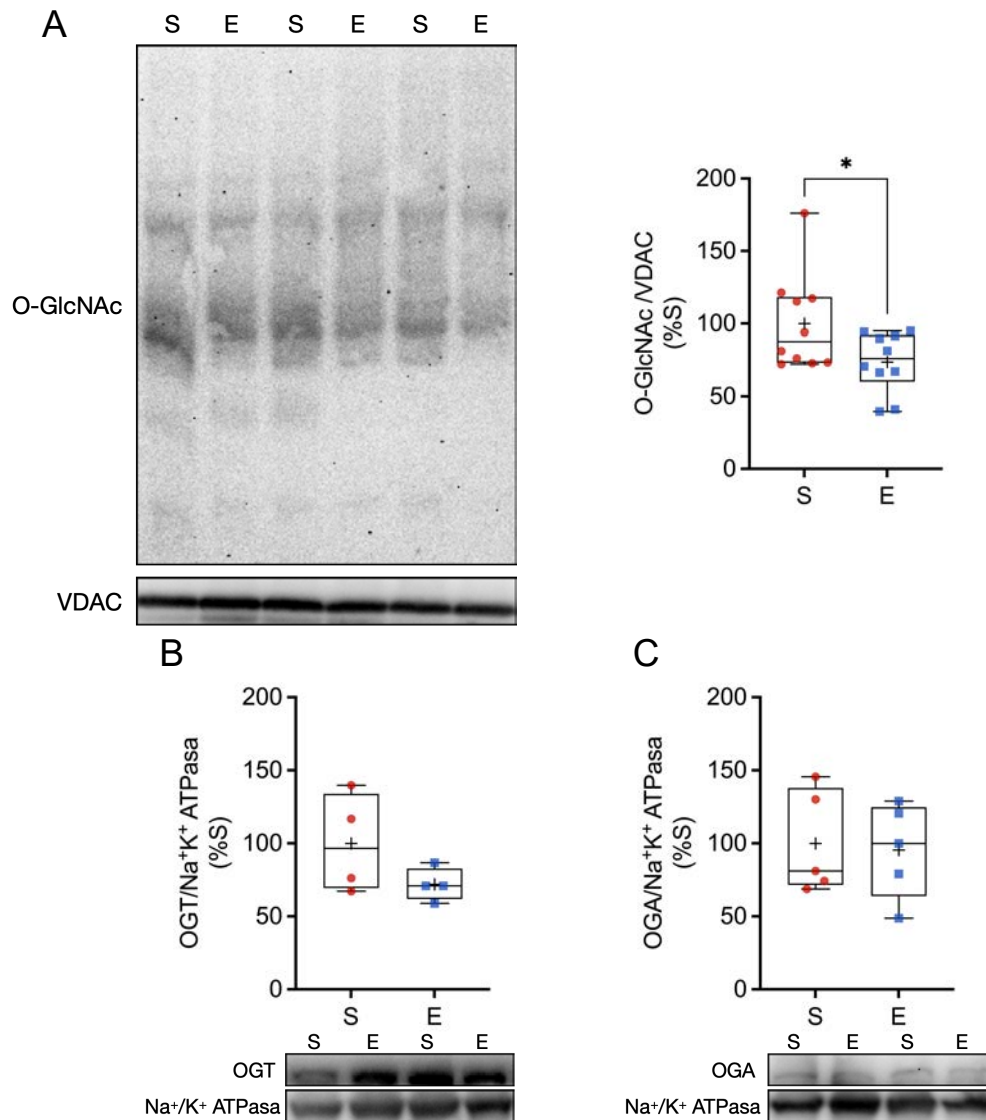


Figura 29. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la O-Gluco-N-Acetilación mitocondrial. A) inmunoblot representativo y cuantificación de los niveles de O-GlcNAc en la fracción mitocondrial, B) expresión proteica relativa de la B) O-GlcNAc transferasa (OGT) y C) O-GlcNAc acetilasa (OGA). S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test.

El entrenamiento aeróbico redujo los niveles de O-GlcNAc en la fracción mitocondrial pero no la expresión relativa de las principales enzimas involucradas -aunque hay una leve tendencia a reducir los niveles de OGT-

(Figura 29). El cambio en la utilización de sustratos para la producción energética, potencialmente, podría ser la causa de la disminución de O-GlcNAc.

4.10 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el estrés oxidativo

Siguiendo la búsqueda de potenciales responsables de la mejora del fenotipo mitocondrial se evaluó si el balance entre producción y eliminación de ROS se veía modificado a nivel tisular. Para este fin, primero se cuantificó la producción de ROS en homogenatos de ventrículo izquierdo en ambos grupos experimentales mediante la sonda H₂DCFDA, y se encontró una menor producción en el grupo entrenado comparado con el grupo sedentario (% S: 100.00 ± 7.80 (11), E: 63.74 ± 7.26 (11)) (Figura 30A). Segundo, se determinó la expresión de gp91 phox, una subunidad de la enzima NADPH Oxidasa 2 (NOX2); cabe recordar que esta enzima junto con las mitocondrias son las principales fuentes de ROS a nivel celular. Se encontró una disminución estadísticamente significativa en la expresión de esta enzima en el grupo E (% S: 100.00 ± 7.24 (6), E: 74.43 ± 3.12 (6)) (Figura 30B). Tercero, se evaluó la expresión y actividad de la enzima antioxidante catalasa, encontrándose la expresión sin cambios (% S: 100.00 ± 22.48 (5), E: 102.8 ± 29.82 (5)) (Figura 30C), mientras que la actividad se vio aumentada en el grupo E respecto al S (% S: 100.00 ± 13.90 (9), E: 172.80 ± 24.31 (9)) (Figura 30D). Cuarto, se evaluó la expresión y actividad de las isoformas 1 y 2 de las enzimas superóxido dismutasas. La isoforma 1 o Cu/Zn-SOD, es la forma citosólica, mientras que la isoforma 2 o Mn-SOD tiene distribución mitocondrial. En cuanto a la expresión de SOD1 (% S: 100.00 ± 17.23 (6), E: 108.90 ± 22.77 (5)) y de SOD2 (% S: 100.00 ± 6.42 (6), E: 100.00 ± 9.85 (5)) no encontramos diferencias entre los grupos (Figura 30E y 30F). Respecto a su actividad, se determinó en ausencia o presencia de KCN; con esta maniobra experimental se puede determinar el aporte individual de cada isoforma a la actividad total. En presencia de KCN la isoforma Cu/Zn-SOD es inhibida, pero no así la isoforma mitocondrial Mn-SOD. Tampoco se encontraron diferencias entre ambos grupos en presencia o ausencia de KCN (IC₅₀ mg, S: 41.24 ± 3.04 (5), E: 51.28 ± 3.29 (4), S_{KCN}: 125.00 ± 3.68 (5), E: 130.90 ± 2.01 (4)) (Figura 30G).

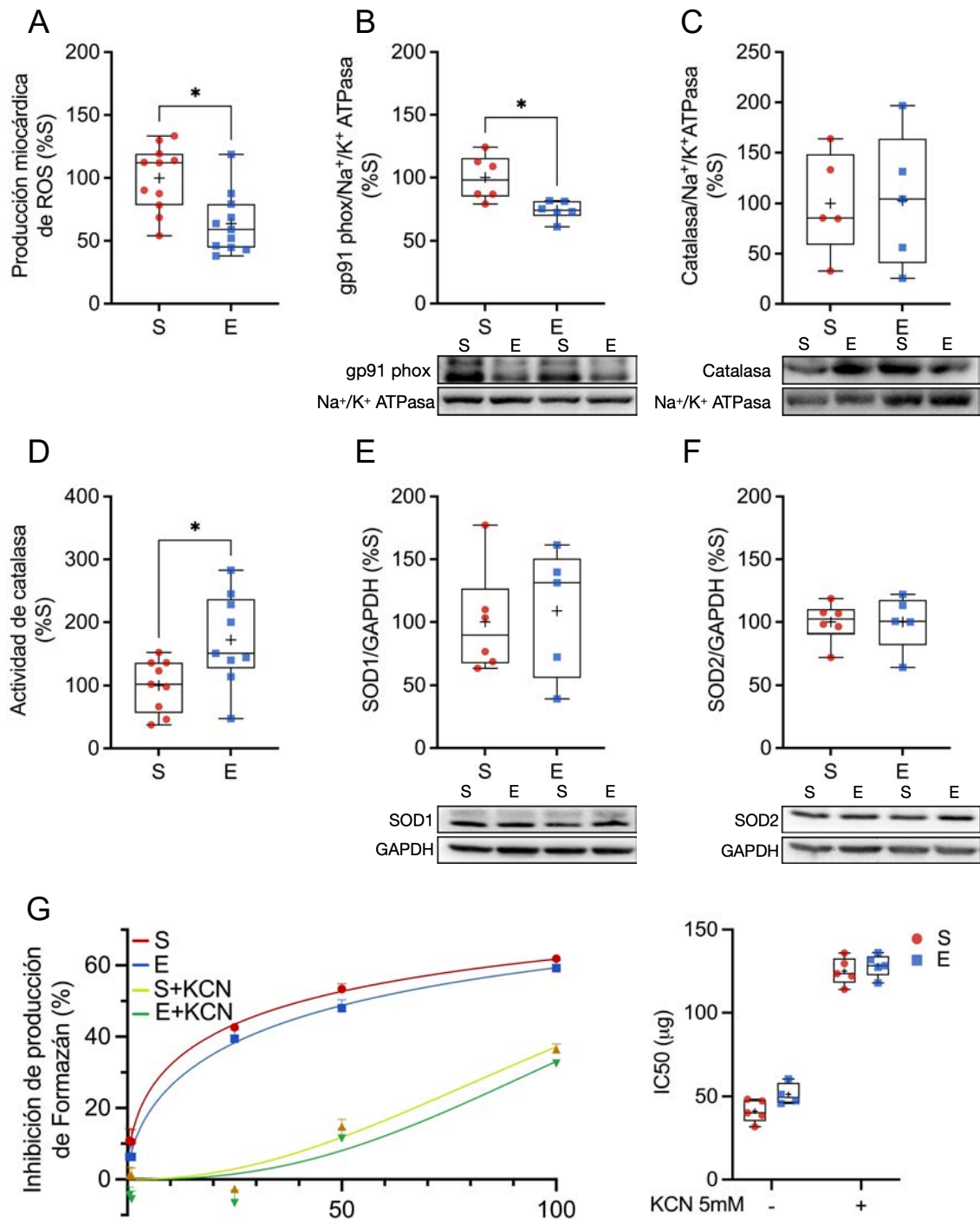


Figura 30. Efectos del entrenamiento aeróbico sobre el estado redox miocárdico. A) producción de ROS por el miocardio. B) Expresión proteica relativa de gp91phox. C) y D) Expresión proteica relativa y actividad de catalasa, respectivamente. E) y F) Expresión proteica relativa de SOD1 y SOD2, respectivamente G) Gráficos promedio de la actividad de las superóxido dismutasas (SOD) y H) estimación de IC50 en ausencia o presencia de 5 mM de KCN. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, *t*-Test o ANOVA de dos vías.

El hecho de no encontrar diferencias en la expresión ni en la actividad de la SOD2 es, en principio, llamativo, ya que se podría esperar que el ejercicio estimule en las mitocondrias los sistemas antioxidantes para contrarrestar la sobrecarga de trabajo de estas. Se realizó la cuantificación de la velocidad la producción de ROS en mitocondrias aisladas de corazones de ambos grupos experimentales, en estado basal, energizado (con el agregado de succinato 5 mM) y desacoplado (con FCCP 5 μ M) (Figura 31A). Se encontró que la velocidad de producción de ROS fue menor en el grupo E respecto al S, tanto en condiciones basales como cuando las mitocondrias fueron energizadas y desacopladas ($F/\text{min}\cdot\text{mg}$, S_{basal} : 0.0085 ± 0.0007 (5), E_{basal} : 0.0046 ± 0.0009 (5) , S_{succi} : 0.0090 ± 0.0006 (5), E_{succ} : 0.0038 ± 0.0009 (5) , S_{FCCP} : 0.0067 ± 0.0008 (4), E_{FCCP} : 0.0036 ± 0.0004 (5)) (Figura 31B). Interesantemente, el desacople de las mitocondrias S como consecuencia del agregado de FCCP redujo significativamente la velocidad de producción de ROS, más no así en las mitocondrias E (Figura 31B).

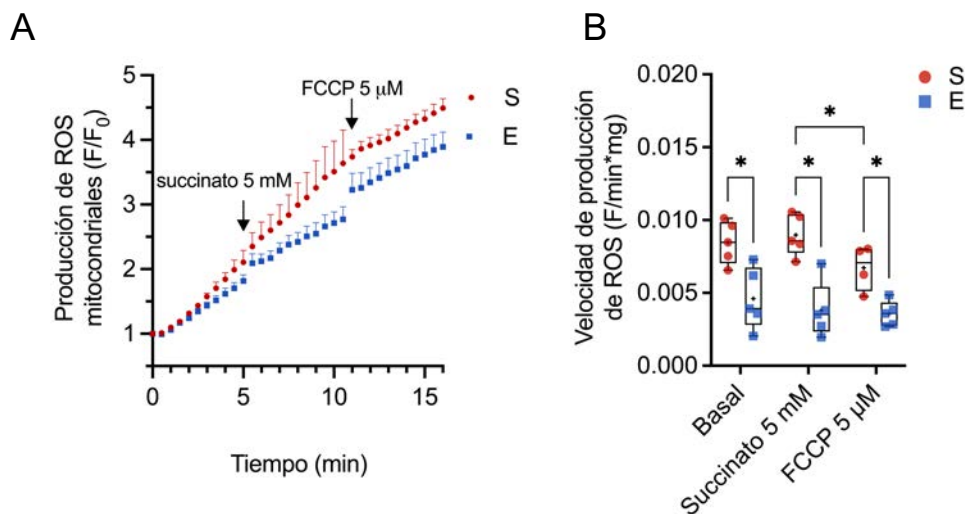


Figura 31. Producción de ROS en mitocondrias aisladas. A) cinética de producción de ROS. B) Pendientes de producción en basal, en presencia de sustratos (succinato 5 mM) y desacopladas (FCCP 5 μ M). S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, ANOVA de dos vías.

Con estos resultados, se puede afirmar que el entrenamiento disminuyó el estrés oxidativo en el miocardio hipertensivo, entendido como la disminución en la producción de ROS no solo a nivel del tejido miocárdico (Figura 30A), sino

también, interesantemente, a nivel mitocondrial; tanto en estado basal y como energizado ([Figura 31B](#)). Además, el desacople en las mitocondrias S, no así en el caso de las E, redujo la velocidad de producción de ROS ([Figura 31B](#)), sugiriendo que quizás exista una saturación de la CTE responsable de la producción de ROS. Todo esto se ve acompañado de una menor expresión de la subunidad crítica de la NOX2 ([Figura 30B](#)) y un aumento de la actividad de la catalasa, sin cambios en la expresión de esta última ([Figura 30C](#) y [30D](#)).

4.11 Efectos del entrenamiento sobre los intercambiadores iónicos sarcolemales y mitocondriales

Con el objetivo de determinar si la rutina de natación durante 8 semanas tenía efectos sobre algunos de los intercambiadores iónicos sarcolemales que han sido descritos con un papel crítico en la hipertrofia cardíaca se realizaron inmunoblots para determinar su expresión relativa. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en la expresión de NCX (% S: 100.00 ± 29.30 (5), E: 106.90 ± 38.78 (5)), NBCe1 (% S: 100.00 ± 22.24 (6), E: 87.15 ± 11.44 (5)) ni NHE-1 (% S: 100.00 ± 11.63 (6), E: 77.47 ± 12.42 (6)) ([Figura 32A](#), [32B](#) y [32C](#)). Además, se estudió la expresión relativa de los intercambiadores NCLX y NHE en la fracción de mitocondrias aisladas, por su vinculación con el manejo del Ca^{2+} y el pH mitocondriales, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en la expresión de NCLX (% S: 100.00 ± 2.86 (6), E: 95.83 ± 5.76 (6)) ni NHE (% S: 100.00 ± 20.51 (7), E: 97.55 ± 9.27 (7)) ([Figura 32D](#) y [32E](#)).

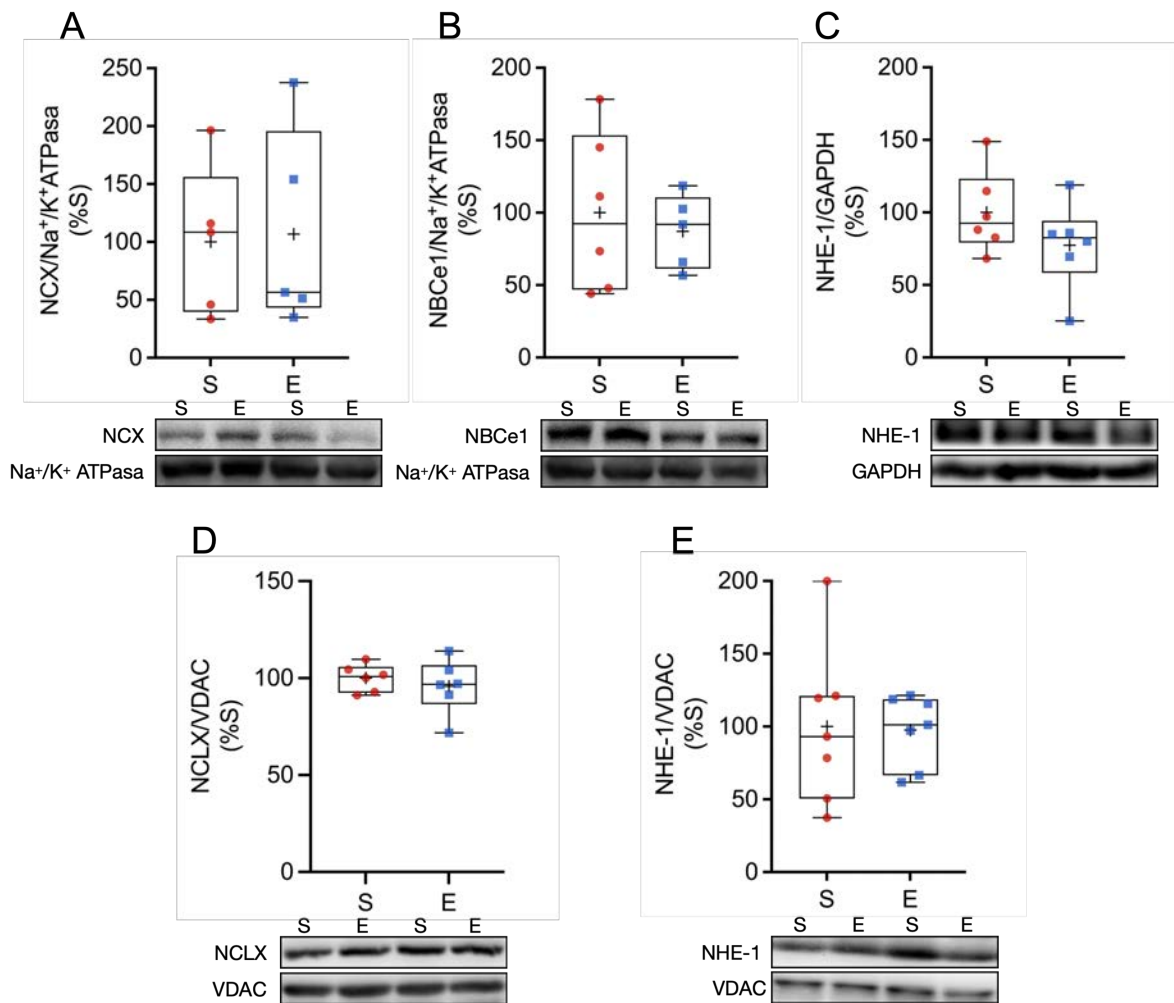


Figura 32. Expresión relativa de distintos transportadores iónicos. Sarcolemales: A) intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX), B) intercambiador electroneutro Na⁺/HCO₃⁻¹ (NBCe1 y C) intercambiador Na⁺/H⁺-1 (NHE-1). Mitocondriales: D) intercambiador Na⁺/Ca²⁺/Li⁺ (NCLX) y E) NHE-1. S: sedentario, E: entrenado, *: p<0.05, t-Test.

El entrenamiento no modificó las expresiones de los principales intercambiadores iónicos involucrados en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, ni en los intercambiadores vinculados con el manejo de Ca²⁺ y pH mitocondrial (Figura 32).

4.12 Rol de las vías cardioprotectoras IGF1/IGF1R y Apelina/APJ en las adaptaciones miocárdicas inducidas por el entrenamiento

Como se mencionó en la introducción, durante el entrenamiento físico se produce un aumento en los niveles séricos y musculares de IGF-1. Con la intención de comenzar a evaluar la participación de la vía IGF-1/IGF1R en los efectos beneficiosos que encontramos en los corazones de las SHR entrenadas, se determinó en homogenatos de ventrículos izquierdos la expresión de IGF1R. La expresión total en los corazones no se vio modificada por la rutina de natación (% S: 100.00 ± 10.87 (6), E: 91.56 ± 6.02 (5)) ([Figura 33A](#)). En la fracción mitocondrial no se encontró IGF1R (resultado no mostrado), indicando que si las mitocondrias están siendo protegidas por esta vía no es por la activación directa de IGF1R presente la mitocondria, sino por el efecto de alguna proteína río abajo, (*downstream*), del receptor de membrana. Además, se midió como indicador de la activación de este receptor la fosforilación en los sitios Tyr luego de inmunoprecipitar al receptor. Dado que el IGF1R es un receptor de tipo tirosinquinasa, su activación promueve su propia fosforilación en dichos residuos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (% S: 100.00 ± 17.31 (4), E: 107.60 ± 6.93 (5)) ([Figura 33B](#)).

Siguiendo con la vía canónica de IGF-1/IGF1R, se evaluó la expresión y la fosforilación de AKT, quinasa principal de la vía de señalización cardioprotectora. Si bien no observamos cambios en su expresión total (% S: 100.00 ± 12.93 (6), E: 88.44 ± 11.73 (5)), sí detectamos un aumento significativo de la forma fosforilada (pAKT %, S: 100.00 ± 5.87 (6), E: 123.40 ± 6.31 (5)) ([Figura 33C](#) y [33D](#)). Por otro lado, también se evaluó la expresión y fosforilación de AMPK, quinasa que funciona como “sensor” intracelular del balance energético (entre consumo y disponibilidad) y es activada ante situaciones en las que se necesita aumentar la producción de energía. No se encontraron diferencias significativas en la expresión (% S: 100.00 ± 16.77 (6), E: 126.5 ± 28.94 (5)) ni en la fosforilación de AMPK (% S: 100.00 ± 15.99 (6), E: 73.32 ± 13.20 (5)) ([Figura 33E](#) y [33F](#)).

Además, se evaluó la expresión de marcadores de la vía de hipertrofia patológica, como lo son la quinasa GSK3 β y la fosfatasa dependiente de Ca²⁺, calcineurina. Respecto a GSK3 β no encontramos diferencias en su expresión (% S: 100.00 \pm 3.78 (10), E: 93.39 \pm 8.59 (10)), pero sí en su fosforilación en el sitio Ser9, el cual es blanco de AKT (% S: 100.00 \pm 9.62 (10), E: 162.2 \pm 20.97 (10)), reforzando el concepto de una mayor actividad de esta última ([Figura 33G](#) y [33H](#)). Respecto a la expresión de calcineurina no hubo diferencias entre ambos grupos (% S: 100.00 \pm 12.58 (9), E: 114.7 \pm 14.92 (9)) ([Figura 28I](#)).

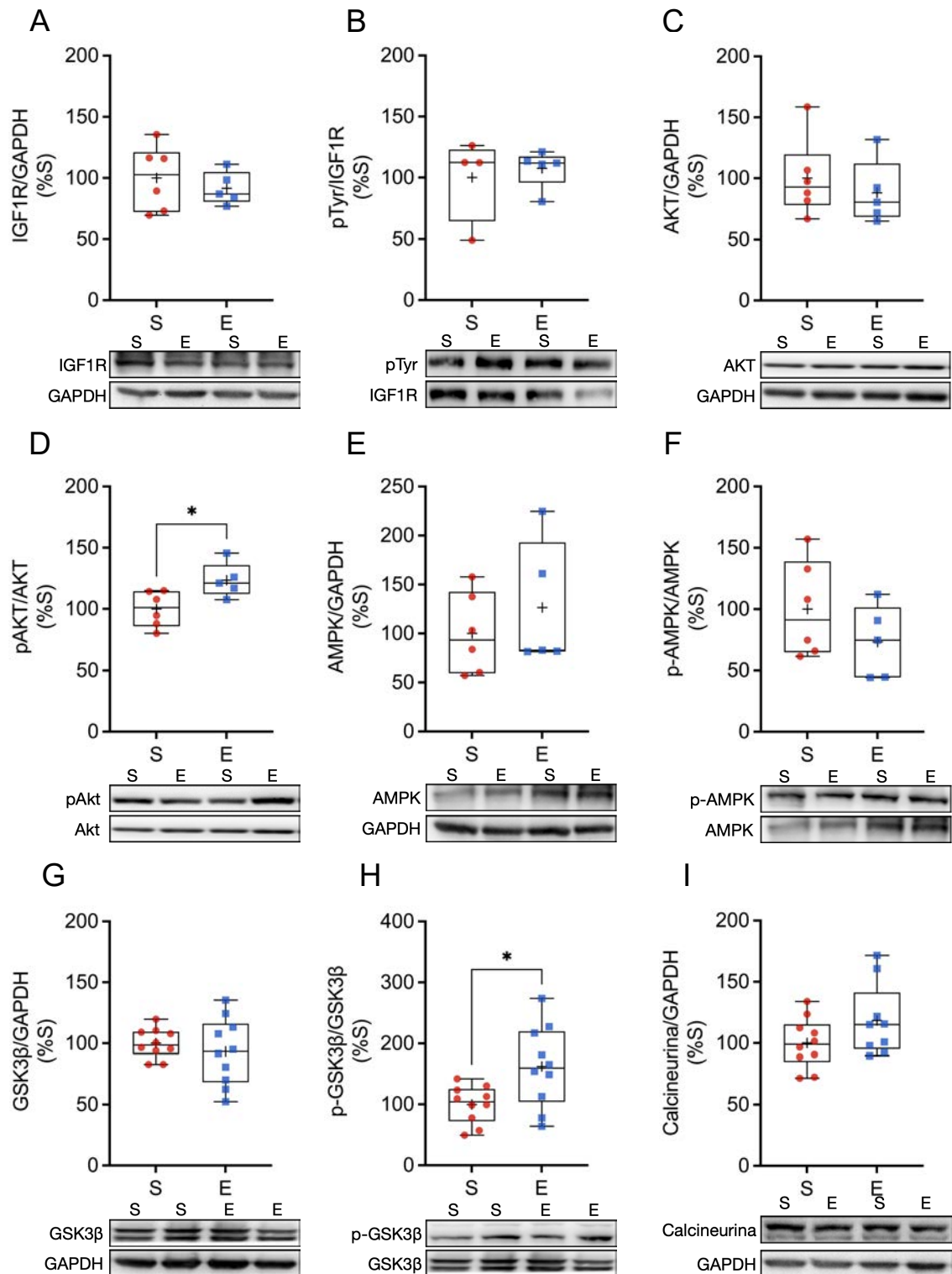


Figura 33. Componentes de las vías de señalización involucradas en las adaptaciones del entrenamiento aeróbico. A) y B) Expresión proteica relativa y fosforilación en Tyr de IGF1R, respectivamente; C) y D) expresión proteica relativa y fosforilación de AKT, respectivamente; E) y F) expresión proteica relativa y fosforilación de AMPK, respectivamente; G) y H) Expresión proteica relativa y fosforilación de GSK3β, respectivamente; y I) expresión proteica relativa de calcineurina. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test.

Por otro lado, la vía Apelina/APJ, que posee efectos cardioprotectores, ha sido vinculada al ejercicio; por lo que también evaluamos si ésta se encontraba activa en nuestro modelo experimental. Para esto se midió la expresión relativa del ARNm de Apelina y de su receptor APJ, así como la expresión relativa, a nivel proteico, de APJ en el miocardio de ambos grupos experimentales. Encontramos un aumento significativo de la expresión del ARNm de Apelina en el grupo E (% S: 100.00 ± 10.57 (6), E: 176.10 ± 19.44 (6)) ([Figura 34A](#)) y un aumento tanto del ARNm (% S: 100.00 ± 6.91 (6), E: 123.50 ± 3.53 (6)) como de la proteína de APJ (% S: 100.00 ± 9.58 (5), E: 159.30 ± 8.84 (4)) respecto al grupo S ([Figura 34B](#) y [34C](#)).

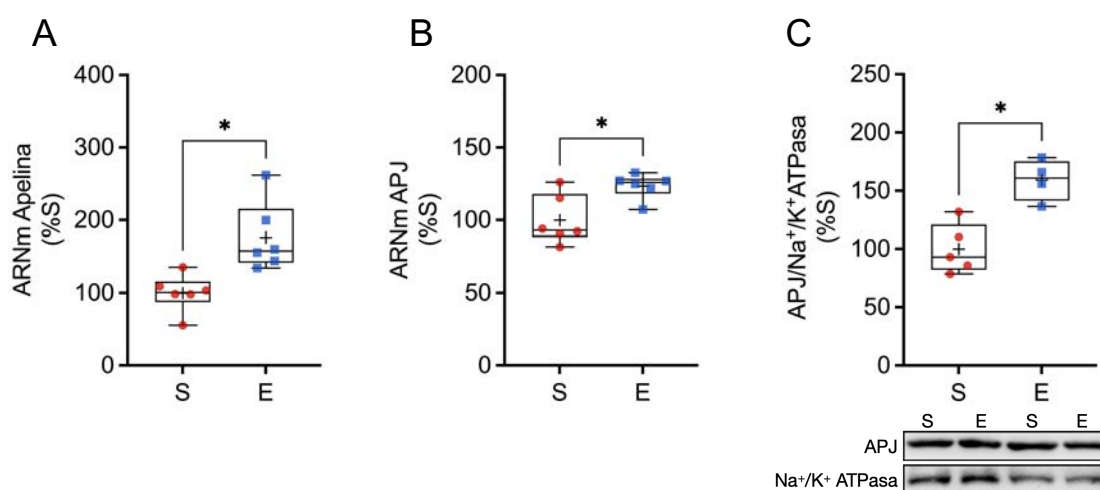


Figura 34. Vía apelina/APJ y entrenamiento aeróbico en el miocardio hipertensivo. Expresión ARNm relativa de A) apelina y B) APJ. C) Expresión proteica relativa de APJ. S: sedentario, E: entrenado, *: $p < 0.05$, t-Test.

Estos resultados sustentan que el entrenamiento aeróbico estimula la vía cardioprotectora IGF-1/IGF1R/AKT/GSK3 β , aún sin cambios detectables en la fosforilación basal del receptor, en la activación de AMPK o la expresión de calcineurina ([Figura 33](#)). Además, evidencian que el entrenamiento aumenta la transcripción de apelina y APJ en el miocardio ([Figura 34](#)), lo que coloca a esta vía de señalización como otra posible mediadora de los efectos evidenciados hasta ahora.

4.13 Efectos agudos de IGF-1 y apelina en cardiomiocitos SHR

Con el objetivo de vislumbrar posibles efectos directos del IGF-1 sobre la producción de ROS y el estado mitocondrial en los cardiomiocitos, se trabajó un modelo in vitro de miocitos aislados de corazones de SHR incubados con IGF-1 durante 15 min en presencia o ausencia del inhibidor farmacológico específico de su receptor, el AG1024.

En primer lugar, se realizó una curva dosis-respuesta al H_2O_2 en cardiomiocitos de SHR, la cual les genera estrés oxidativo en distintos grados (Figura 35A). Al observar los cambios en la pendiente de producción de ROS antes y después del pulso de H_2O_2 , se eligió trabajar con la concentración 25 μM , que mostró un efecto oxidante leve (Figura 35B).

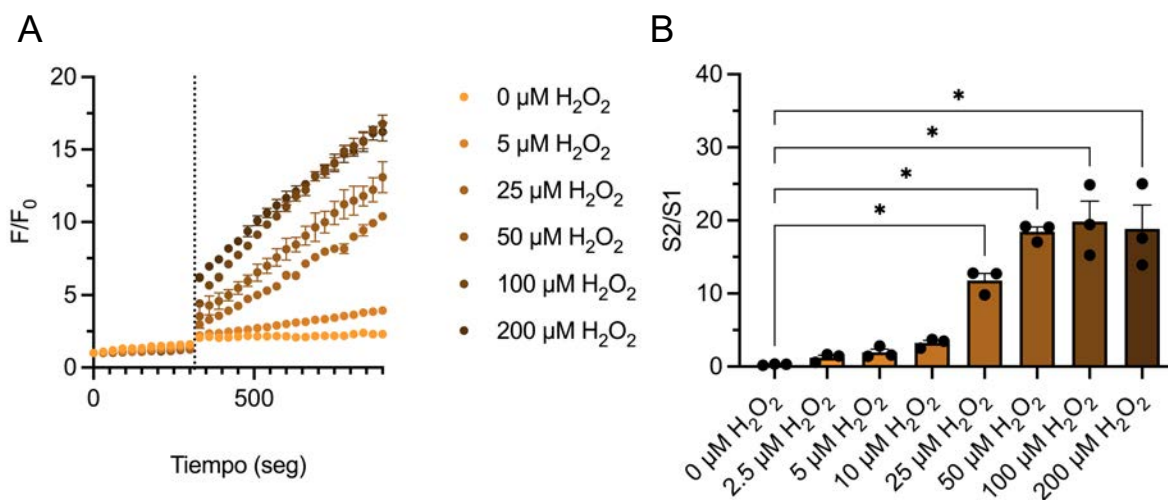


Figura 35. Producción de ROS en cardiomiocitos aislados de SHR expuestos a distintas concentraciones de H_2O_2 . A) Cinética de producción de ROS con H_2DCFDA . B) cuantificación de la relación de cambio de las pendientes de producción antes ($S1$) y después ($S2$) del agregado de H_2O_2 . *: $p < 0.05$, ANOVA de una vía con corrección de Dunnett.

Luego, cardiomiocitos preincubados con IGF-1 10 nM y/o AG1024 100 nM se expusieron al mismo estrés oxidativo leve (H_2O_2 25 μM), o a una despolarización leve inducida con un desacoplante químico (FCCP 500 nM). La producción basal de ROS

no se vio modificada por los pretratamientos ([Figura 36A](#)). El estrés oxidativo generó un aumento en la producción de ROS e IGF-1 fue capaz de evitar este aumento ([Figura 36B](#)). La despolarización parcial de las mitocondrias no produjo cambios en la producción de ROS ([Figura 36C](#)). Los valores de las pendientes antes y después del estímulo se presentan en la [Tabla 4](#).

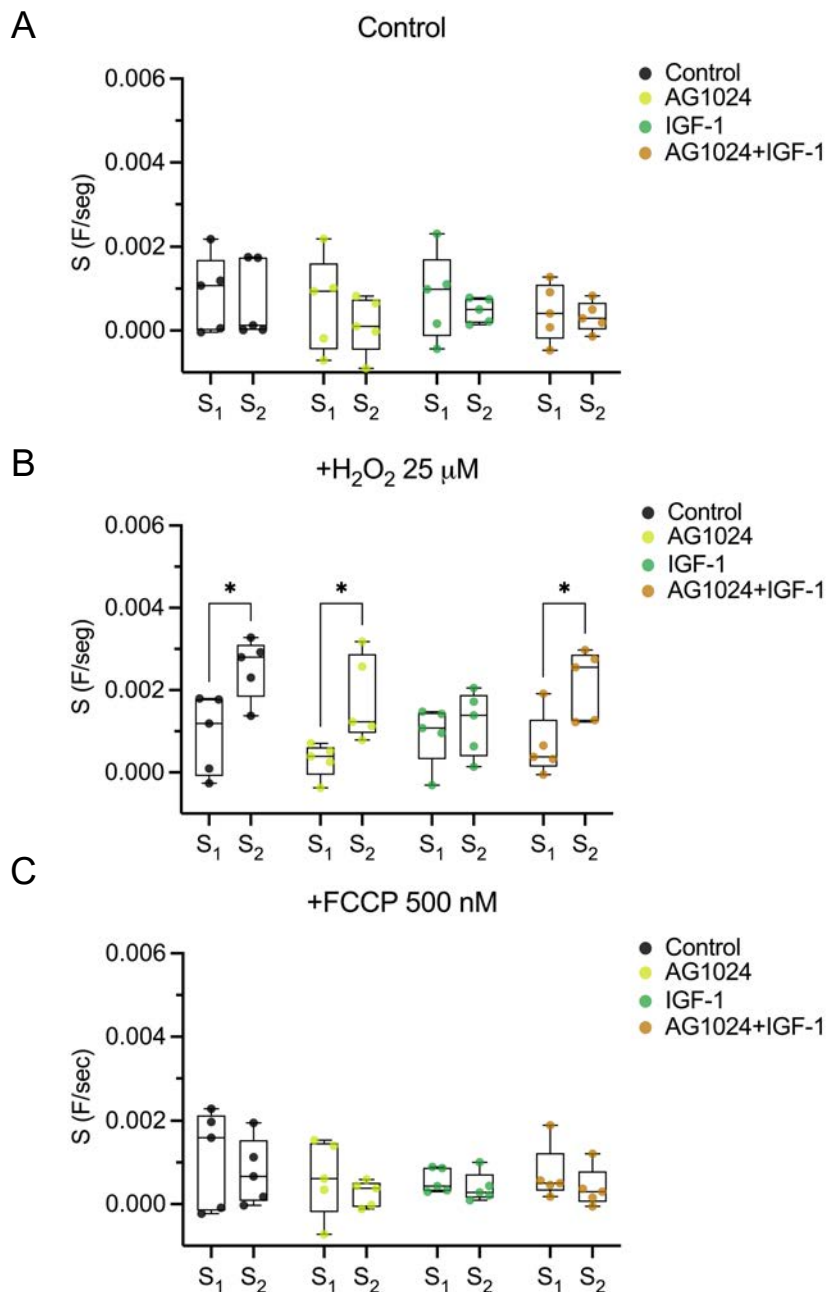


Figura 36. Velocidad de producción de ROS en cardiomiocitos aislados de SHR pretratados con IGF-1 10 nM y/o AG1024 100nM ante distintos estímulos. Velocidad de producción de ROS A) sin

estímulos (control), B) en presencia de H₂O₂ 25 μM y C) en presencia de FCCP 500 nM. S1: antes del estímulo, S2: después del estímulo. *: p<0.05, T-test.

		Control	AG1024	IGF-1	AG1024+IGF-1
Control	S ₁	0.00089 ±	0.00065 ±	0.00083 ±	0.00044 ±
		0.00041 (5)	0.00051 (5)	0.00047 (5)	0.00031 (5)
	S ₂	0.00073 ±	0.00013 ±	0.00048 ±	0.00033 ±
		0.00042 (5)	0.00030 (5)	0.00013 (5)	0.00016 (5)
H ₂ O ₂ 25 μM	S ₁	0.00092 ±	0.00030 ±	0.00093 ±	0.00065 ±
		0.00043 (5)	0.00018 (5)	0.00032 (5)	0.00034 (5)
	S ₂	0.00254 ±	0.00178 ±	0.00119 ±	0.00216 ±
		0.00033 (5) *	0.00046 (5) *	0.00035 (5)	0.00038 (5) *
FCCP 500 nM	S ₁	0.00111 ±	0.00063 ±	0.00056 ±	0.00072 ±
		0.00053 (5)	0.00041 (5)	0.00013 (5)	0.00030 (5)
	S ₂	0.00078 ±	0.00025 ±	0.00041 ±	0.00040 ±
		0.00035 (5)	0.00014 (5)	0.00016 (5)	0.00022 (5)

Tabla 4. Velocidad de producción de ROS en cardiomiocitos aislados de SHR pretratados con IGF-1 10nM y/o AG1024 100 nM con distintos estímulos. S1: velocidad antes del estímulo, S2: velocidad después del estímulo. *: p<0.05, ANOVA de dos vías.

Por último, se evaluó el $\Delta\Psi_m$ con estos dos tratamientos -estrés oxidativo y despolarización mitocondrial- en los cardiomiocitos pretratados con IGF-1 y/o AG1024. La preincubación per se no modificó el $\Delta\Psi_m$ (% Control: 100.0 ± 0.0 (7), IGF-1: 102.1 ± 9.5 (7), AG1024: 99.7 ± 8.2 (7), AG1024+IGF-1: 93.5 ± 7.5 (7)) (Figura 37A). Ninguno de los pretratamientos fue capaz de evitar la caída de $\Delta\Psi_m$ por los desacoplantes químicos en baja y alta concentración - FCCP 500nM (% Control: 61.9 ± 5.1 (7), IGF-1: 57.8 ± 2.9 (6), AG1024: 66.0 ± 5.0 (7), AG1024+IGF-1: 65.7 ± 5.3 (7)) y FCCP 5 μM (% Control: 39.1 ± 2.5 (6), IGF-1: 36.6 ± 2.6 (6), AG1024: 34.2 ± 5.3 (6), AG1024+IGF-1: 30.1 ± 4.4 (6)) respectivamente - (Figura 37B y 37C). El estrés oxidativo leve no fue capaz de producir una despolarización en las mitocondrias de los cardiomiocitos, y los tratamientos no tuvieron efecto en el $\Delta\Psi_m$ (% Control: 86.2 ± 6.6 (6), IGF-1: 89.2 ± 6.4 (6), AG1024: 97.9 ± 8.5 (6), AG1024+IGF-1: 89.5 ± 9.7 (6)) (Figura 37D).

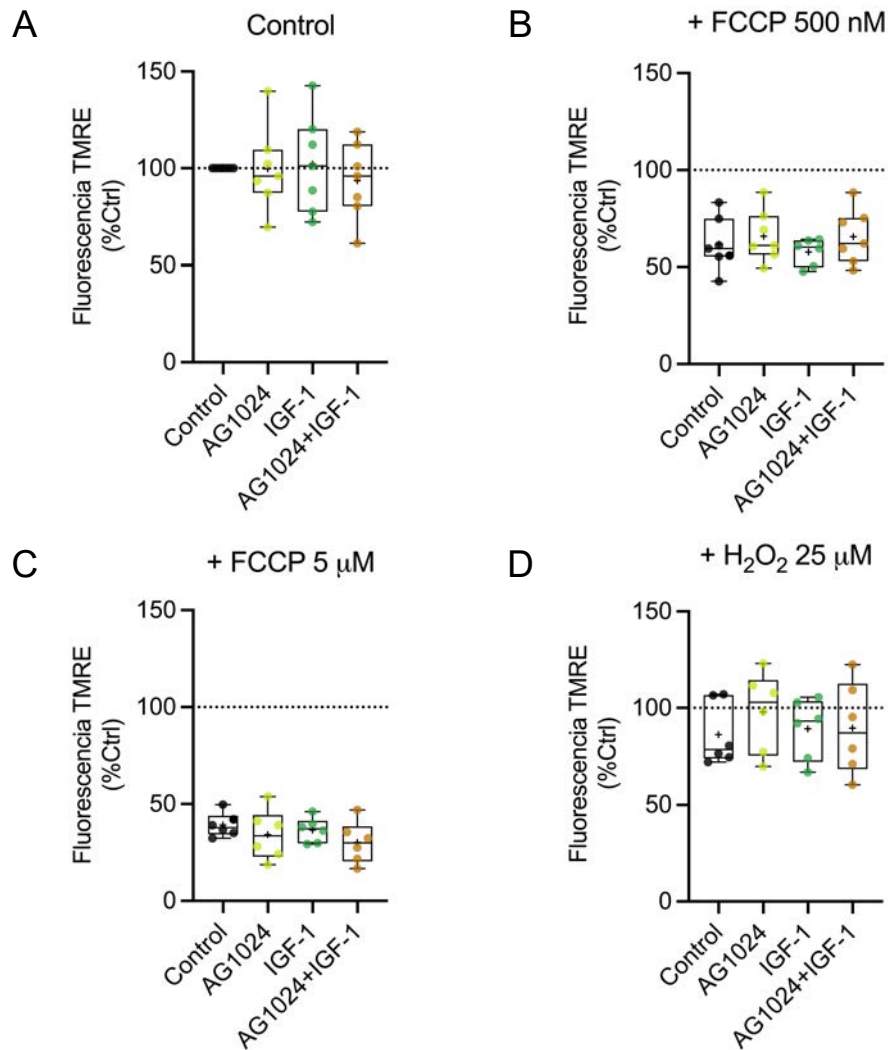


Figura 37. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en cardiomiocitos aislados pretratados con IGF-1 10 nM y/o AG1024 100 nM ante distintos estímulos. Fluorescencia de TMRE A) sin estímulos (control), B) FCCP 500 nM, C) FCCP 5 μ M y D) H_2O_2 25 μ M. ANOVA de una vía.

En otra tanda de experimentos realizados también en cardiomiocitos aislados de SHR se evaluó la existencia de un posible entrecruzamiento o “crosstalk” entre las vías de señalización de IGF-1 y apelina. Evaluamos si el tratamiento agudo con IGF-1 10 nM o apelina 50 nM, en presencia de antagonistas cruzados de sus respectivos receptores (AG1024 100 nM o ML221 10 μ M, como inhibidores específicos de IGF1R o de APJ, respectivamente) modificaba la velocidad de producción de ROS o el $\Delta\Psi_m$ frente al estímulo oxidante de 100 μ M de H_2O_2 .

Como ya habíamos detectado, IGF-1 redujo la velocidad de producción de ROS frente al estímulo oxidante, efecto que no solo se canceló en presencia del antagonista de su receptor específico, sino que, sorprendentemente también se evitó en presencia del antagonista del receptor de apelina, ML221 (% Control: 100.0 ± 9.9 (12), IGF-1: 61.8 ± 6.5 (5), AG1024+IGF-1: 107.7 ± 8.4 (10), ML221+IGF-1: 88.1 ± 7.4 (7)) (Figura 38A). De la misma manera, cuando se incubó con apelina también se redujo la velocidad de producción de ROS, efecto que se previno en presencia del antagonista del receptor APJ o en presencia de AG1024, (% Control: 100.0 ± 7.5 (15), apelina: 71.2 ± 5.2 (9), ML221+apelina: 91.3 ± 4.0 (6), AG12024+apelina: 85.6 ± 3.0 (5)) (Figura 38B). Cabe resaltar que los inhibidores farmacológicos por sí solos no modificaron la velocidad de producción de ROS (% AG1024: 112.8 ± 14.3 (6), ML221: 108.5 ± 15.4 (8)) (barras luego de la línea punteada vertical Figura 38A y 38B).

Por otro lado, respecto al $\Delta\Psi_m$ la incubación con IGF-1 previno la caída de este inducida por estrés oxidativo fuerte ($100 \mu\text{M}$ de H_2O_2), mientras que la co-incubación con los inhibidores no protegió a las mitocondrias de la despolarización (% Control: 100.0 ± 4.3 (16), IGF-1: 127.1 ± 2.4 (12), AG1024+IGF-1: 106.9 ± 7.0 (5), ML221+IGF-1: 106.8 ± 5.6 (7)) (Figura 38C). Por su parte, apelina también previno la caída del $\Delta\Psi_m$ y la presencia los inhibidores canceló el efecto (% Control: 100.0 ± 2.3 (13), apelina: 116.5 ± 3.7 (9), ML221+apelina: 98.3 ± 5.1 (5), AG12024+apelina: 105.4 ± 7.8 (4)) (Figura 38D). Los inhibidores por sí solos tampoco tuvieron efecto sobre el $\Delta\Psi_m$ (% AG1024: 142.5 ± 4.4 (2), ML221: 93.8 ± 3.5 (2)) (barras luego de la línea punteada vertical Figura 38C y 38D).

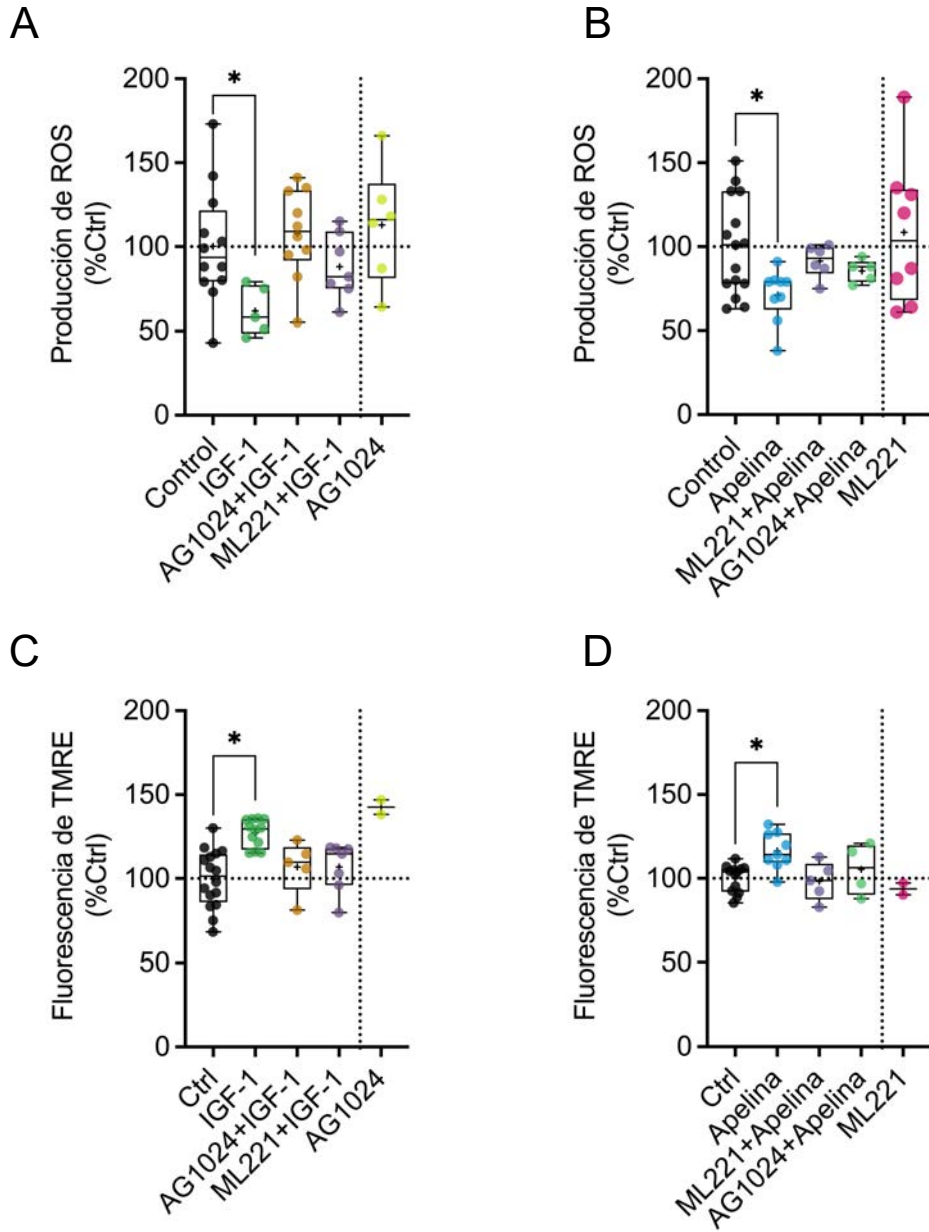


Figura 38. Efectos de la inhibición de las vías de IGF-1 y apelina sobre la producción de ROS y el $\Delta\Psi_m$ frente estímulo oxidativo (H_2O_2 100 μM). A) Producción de ROS en presencia o ausencia de IGF-1 10 nM, AG1024 100 nM o ML221 50 μM , B) producción de ROS en presencia o ausencia de apelina 50 nM, AG1024 o ML221. C) $\Delta\Psi_m$ en presencia o ausencia de IGF-1, AG1024 o ML221, D) $\Delta\Psi_m$ en presencia o ausencia de apelina 50 nM, AG1024 o ML221. ANOVA de una vía-Dunnett.

Estos resultados sustentan que el tratamiento con IGF-1 o apelina tiene un efecto protector al atenuar la producción de ROS (Figura 36B y 38A). El efecto

sobre el $\Delta\Psi_m$ ([Figura 37](#)), parece ser dependiente del estímulo, pero la protección es evidente frente al estrés oxidativo fuerte ([Figura 38C](#) y [38D](#)). La presencia de los inhibidores evitó los efectos causados por los agonistas y plantea la posibilidad de una interconexión entre la vía IGF-1/IGF1R y apelina/APJ ([Figura 38](#)).

5. *Discusión y conclusiones*

5.1 *Efectos del entrenamiento aeróbico en la función cardiovascular*

Como se demostró en el apartado anterior, el entrenamiento aeróbico generó diversos cambios beneficiosos a niveles supra e intracelulares.

El protocolo de natación redujo el aumento del peso corporal de los animales a pesar de que dicho grupo de ratas aumentó la ingesta de alimento ([Tabla 2](#)). Esto no resulta sorprendente si tenemos en cuenta que la realización de ejercicio físico demanda una mayor producción de ATP, estimulando el consumo de reservas de energía como las de hidratos de carbono, en primer lugar, y luego las reservas de grasas, lo que atenuaría el incremento del peso corporal a pesar del aumento de la ingesta alimentaria.

El tipo de ejercicio a realizar determina cuáles fibras musculares se ponen en juego en mayor o menor medida. En los ejercicios anaeróbicos -e. g. en el levantamiento de pesas o ejercicio de alta intensidad por intervalos, HIIT- donde la energía se necesita de forma rápida, se ponen en juego mayoritariamente fibras de tipo IIA y IIX, las cuales obtienen el ATP principalmente de reacciones citosólicas y tienen un menor número de mitocondrias por célula, lo que fenotípicamente da al músculo un color más blanco. En cambio, en los ejercicios aeróbicos o de resistencia se reclutan fibras de tipo I que son más lentas para producir energía, pero son más resistentes a la fatiga, tienen un gran número de mitocondrias y por ello estos músculos son de color rojo ^{221,222}. Está descrito en la bibliografía que la actividad de la enzima mitocondrial del ciclo de Krebs, CS a nivel muscular, aumenta en diversos modelos de ejercicio aeróbico y es utilizada como marcador de entrenamiento ²²³⁻²²⁷. En este trabajo se utilizó el músculo sóleo para determinar si los animales estaban entrenados aeróbicamente, puesto que es un músculo esquelético rojo. Si bien, en el presente proyecto no se caracterizó el tipo de ejercicio aeróbico que realizaron los animales, los autores que describieron previamente el modelo lo definieron como de baja/moderada intensidad y de larga duración debido al mejoramiento en la capacidad oxidativa del músculo ¹⁹⁷. Por lo tanto, el aumento hallado en la actividad

de la enzima CS en músculo sóleo puede ser considerado un buen marcador del correcto entrenamiento de los animales sometidos al protocolo de ejercicio aeróbico ([Tabla 2](#)).

El impacto cardiovascular del entrenamiento en el modelo murino utilizado se evaluó desde tres ópticas diferentes.

La primera, mediante la medida de PAS, arrojó que el entrenamiento aeróbico tuvo efectos beneficiosos. Si bien no normalizó las cifras de presión arterial, es decir los animales se mantuvieron hipertensos, la PAS no continuó incrementándose con el transcurso de los días a diferencia de lo que sí sucedió en el grupo de ratas S ([Figura 13D y 13E](#)).

La segunda óptica fue mediante la realización de registros ecocardiográficos. Estos indicaron que el entrenamiento aeróbico produjo una mejora de la función cardíaca, evidenciada por el aumento del porcentaje de acortamiento medioventricular y la fracción de acortamiento endocárdica ([Figura 14D y 14E](#)). Además, demostraron que la masa ventricular y las dimensiones de la cámara ventricular izquierda en sístole y en diástole no se vieron sustancialmente modificadas. Estos resultados son esperables ya que con el entrenamiento no se espera que ocurra la regresión de la hipertrofia cardíaca patológica, sino que vire hacia un fenotipo fisiológico, tal como nuestro grupo demostró anteriormente ⁶⁵.

La tercera y última óptica fue mediante el estudio de electrocardiogramas en busca de modificaciones en la generación y/o propagación del estímulo eléctrico en las ratas E ([Figura 16](#)). Para nuestra sorpresa encontramos un aumento en la amplitud del complejo QRS en las ratas E comparadas antes y después del protocolo de natación. Esto podría sugerir que los corazones entrenados tienen mayor masa miocárdica eléctricamente activa. Sin embargo, estos resultados no se acompañan con lo obtenido por el pesaje de los corazones en balanza o por las determinaciones ecocardiográficas de masa, por lo que quizás sea un artefacto de la técnica electrocardiográfica empleada, ya que los valores presentaron mucha dispersión. Por otro lado, encontramos que tanto la frecuencia, la duración del intervalo RR y del

intervalo QTc se veían modificados; pero dado que las ratas se encontraban anestesiadas de forma inhalatoria - lo que produce una depresión de la frecuencia cardíaca- creemos que no resulta apropiado comparar estos parámetros, ni atribuir las modificaciones a los efectos producidos por el entrenamiento aeróbico. Un dato obtenido por los ECG que resulta potencialmente de relevancia clínica es la duración de la onda P; el entrenamiento aeróbico fue capaz de evitar el incremento que se observó en las ratas sedentarias al cabo de las 8 semanas del protocolo experimental. Diversos estudios en humanos demostraron que la prolongación de la onda P está asociada de forma independiente con mayor incidencia y recurrencia de fibrilación auricular, accidente cerebrovascular embólico y muerte ^{228,229}. Esta asociación posiblemente se deba a que la prolongación de la onda P se puede dar por remodelado fibrótico y/o agrandamiento de la cámara auricular, lo que promueve la disfunción electromecánica, además de interferir con la contractilidad auricular ²³⁰⁻²³².

Considerando los resultados obtenidos al abordar el estudio desde estas tres ópticas, podemos concluir que el entrenamiento produjo modificaciones beneficiosas a nivel del organismo entero; puntualmente evitó el aumento progresivo de la PAS y mejoró la función de bomba del corazón. Esto es de suma importancia cuando se quiere extrapolar a humanos, donde el entrenamiento, si bien no resuelve la hipertensión arterial, ejerce un efecto cardioprotector, retrasando o aun evitando la progresión a insuficiencia cardíaca.

5.2 Efectos del entrenamiento aeróbico sobre la hipertrofia del miocardio hipertensivo

Como se mencionó anteriormente la sobrecarga hemodinámica inducida por el aumento de la presión arterial promueve la hipertrofia patológica del corazón. Por otro lado, el entrenamiento aeróbico también promueve el aumento de la masa cardíaca, pero en este caso dando lugar a la hipertrofia fisiológica. Por lo que, la ausencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales en los

resultados respecto a la masa del ventrículo izquierdo, obtenidos tanto por ecocardiografía ([Tabla 3](#)) como por balanza - PC/LT y PVI/LT- ([Figura 13B](#)) no debe resultar sorprendente. Ambos grupos de animales se mantienen bajo sobrecarga hemodinámica (hipertensión con o sin ejercicio) y, por lo tanto, no se espera que el entrenamiento induzca la reversión de la hipertrofia patológica, sino que promueva su transformación a un fenotipo fisiológico.

Nuestro grupo ya demostró en un trabajo publicado en el año 2013 ⁶⁵ que el entrenamiento aeróbico produce la disminución de los depósitos de colágeno intersticial y un aumento en el área transversal de los cardiomiocitos y de la abundancia de capilares sanguíneos. En el trabajo de esta tesis no se repitieron estas determinaciones, pero sí se cuantificó por qPCR la expresión relativa de ARNm de los colágenos 1 y 3 (col1a1 y col3a1, respectivamente) ([Figura 17A y 17B](#)), detectándose una tendencia al aumento, aunque no significativo, en las expresiones de ambos sin cambios en la relación entre las isoformas. Esto podría indicar que el entrenamiento mediante el remodelado que produce en el corazón genera nuevas reservas de colágeno. Sin embargo, acompañando a estos resultados, encontramos una disminución de la expresión de la metaloproteasa-2 de la matriz (MMP2) ([Figura 17D](#)) y del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) ([Figura 17E](#)) en las ratas sometidas al entrenamiento, lo que indicaría que está ocurriendo un remodelado, probablemente más fisiológico, de la matriz extracelular del miocardio hipertensivo. El posible aumento de las reservas de colágeno en el grupo E nos resulta llamativo, por lo que hemos empezado a realizar determinaciones de ecocardiografía bidimensional con *speckle-tracking*, ya que los parámetros de función clásicos obtenidos por ecocardiografía, fracción de eyección y porcentaje medioventricular, tienen baja sensibilidad para la determinación de disfunción cardíaca temprana ²³³. Si bien son resultados preliminares y resulta necesario agregar nuevos animales al estudio (datos no incluidos), observamos que el entrenamiento tiende a aumentar el porcentaje de deformación del ventrículo izquierdo durante el ciclo cardíaco. Por lo que esa tendencia a aumentar en los niveles de expresión de las isoformas de colágeno 1 y 3 no se estaría traduciendo en alteraciones en la distensibilidad del

corazón. Nuevamente, esto último es necesario corroborarlo mediante más determinaciones.

Por otro lado, la disminución encontrada en la expresión del ARNm de ANP y la tendencia a la disminución en β -MHC ([Figura 17H y 17G](#)) pueden interpretarse como indicadores de reversión del tipo patológico de hipertrofia, reflejando la transición a un fenotipo fisiológico, tal como lo sustenta la mejoría de la función contráctil y las modificaciones mitocondriales que observamos en las ratas E.

5.3 El entrenamiento aeróbico mejora el estado redox del miocardio hipertenso

Como se mencionó en la introducción (Capítulo 1.5) el miocardio hipertensivo cursa con un aumento del estrés oxidativo, principalmente mediado por la liberación de factores neurohumorales (Ang-II y ET-1) que tienen efectos autocrinos y paracrinos que estimulan la producción de ROS a nivel de una de las principales fuentes intracelulares, las NADPH oxidasas (NOX2 y NOX4)⁸⁸. El aumento en la actividad de las NOX promueve un mecanismo que es perjudicial para la célula conocido como liberación de ROS inducida por ROS. La oxidación de proteínas y lípidos presentes en la mitocondria, por ejemplo, de los complejos de la CTE y la cardiolipina, comprometen el correcto flujo de electrones a través de la CTE que puede provocar un flujo retrógrado de electrones que incrementa en gran medida la producción de anión O_2^- y H_2O_2 en la mitocondria²³⁴. Además, la oxidación de las cadenas laterales de la cardiolipina promueve que la unión del citocromo C a la membrana interna de la mitocondria sea más débil y adopte una función de peroxidasa, contribuyendo aún más al estrés oxidativo²³⁵. El incremento de los ROS tanto mitocondriales como citosólicos termina promoviendo la despolarización mitocondrial y esto a su vez exagera aún más la producción de ROS mitocondriales²³⁴. Por los mecanismos hasta ahora expuestos, el balance redox es sumamente importante para la correcta función mitocondrial y un desequilibrio hacia el lado prooxidante puede conllevar a

la retroalimentación positiva de la producción de ROS, que termina desencadenando la activación de vías pro-apoptóticas en el cardiomiocito^{31,215,236}.

En esta tesis doctoral demostramos una reducción significativa en la producción global de ROS por el miocardio hipertensivo en las ratas que realizaron la rutina de entrenamiento aeróbico ([Figura 30A](#)). Sin embargo, por la técnica empleada no podemos distinguir si una especie en particular fue más afectada que otras. Además, demostramos que la producción de ROS también es menor en las mitocondrias cardíacas aisladas de los animales entrenados ([Figura 31](#)), sugiriendo que la liberación mitocondrial de ROS inducida por ROS estaría siendo menos estimulada. Estos resultados se acompañan con una reducción de la expresión de la subunidad gp91-phox de la NOX2 ([Figura 30B](#)), lo que también contribuiría a reducir el estrés oxidativo.

Está ampliamente descrito que el ejercicio físico estimula a los mecanismos antioxidantes intracelulares, sin embargo, cuál -o cuáles- de los distintos mecanismos es el estimulado parece depender del modelo y tipo de ejercicio^{224-226,237,238}. En este trabajo de tesis estudiamos tres enzimas de gran relevancia: la catalasa, que degrada H_2O_2 en H_2O y O_2 ; y las superóxido dismutasas citosólica y mitocondrial (SOD1 y SOD2), que dismutan el O_2^- utilizando H_2O para producir H_2O_2 . En los corazones de las ratas entrenadas observamos un incremento de la actividad de la catalasa ([Figura 30C y 30D](#)), pero no de su expresión, indicando que probablemente esto se deba a alguna modificación postraducciona en la enzima que aún no hemos tenido oportunidad de investigar. Además, sabiendo que la mitocondria principalmente produce O_2^- y que las mitocondrias producen menos ROS, cabría esperar que las SOD no jugaran un rol tan crítico en las adaptaciones inducidas por el entrenamiento lo que podría explicar, en parte, que no encontramos cambios en la expresión ni en la actividad de estas enzimas ([Figura 30E, 30F y 30G](#)).

5.4 La ultraestructura del cardiomiocito como blanco del entrenamiento aeróbico

Considerando lo discutido hasta ahora, podemos sostener que la rutina de natación mantenida durante 8 semanas estimuló el viraje del fenotipo hipertrófico patológico hacia uno más fisiológico con mejoras en la función cardiovascular de las ratas hipertensas. Aún no ha sido completamente esclarecido si el entrenamiento tiene efectos sobre la ultraestructura contráctil/energética de los cardiomiocitos -es decir en la disposición de los sarcómeros y la red mitocondrial. Existen estudios que postulan que en la hipertrofia cardíaca patológica los miocitos pueden aumentar su tamaño por deposición de sarcómeros en serie o en paralelo, mientras que en la hipertrofia fisiológica el crecimiento de la masa ocurre por incorporación de sarcómeros en serie y en paralelo, aumentando el tamaño celular de forma proporcional ¹⁷. Si bien este último aspecto no fue analizado en el presente trabajo de tesis, avanzamos en el estudio de los efectos de la rutina de natación sobre la relación estructural entre los sarcómeros y las mitocondrias, por su rol crucial en la función de la bomba cardíaca. Analizamos imágenes de microscopía electrónica de cortes longitudinales de ventrículos izquierdos y detectando que la longitud de los sarcómeros no se modificó en las ratas E comparada con el grupo S ([Figura 18B](#)). Específicamente en relación con las mitocondrias, de las tres poblaciones presentes en los cardiomiocitos -perinucleares, subsarcolemales e interfibrilares-, decidimos focalizar el estudio en las interfibrilares, ya que éstas son las que aportan mayoritariamente el ATP necesario para la maquinaria contráctil.

Al analizar las mitocondrias interfibrilares de los mismos cortes no detectamos mayores cambios en la morfología de estas, aunque sí parecieran ser más ovaladas aquellas de las ratas E ([Figura 18B](#)). Lo que captó fuertemente nuestra atención fue que la distribución y el desarreglo de estas organelas evidente en las muestras de corazones de ratas hipertensas no entrenadas -S- parecieran modificarse por el entrenamiento aeróbico ([Figura 18A](#)). Como se mencionó anteriormente, dentro de los desarreglos de las ratas S sobresalieron: interrupciones de los haces de sarcómeros, *clusters* de mitocondrias interfibrilares y pérdida del entramado

sarcómero/mitocondria. Para evitar que fuese solamente un resultado cualitativo desarrollamos 3 estrategias diferentes para cuantificar el grado de ordenamiento mitocondrial en ambos grupos experimentales. Estas son: 1) determinar la cantidad de vecinos que tiene una mitocondria en el cardiomiocito; 2) cuantificar la cantidad de *clusters* mitocondriales por foto, entendiendo como un *cluster* a una mitocondria rodeada por al menos 4 vecinas; y 3) calcular la GSE como parámetro de uniformidad de la distribución de las mitocondrias. Antes de implementar las estrategias calculamos la mediana de la distancia entre mitocondrias vecinas, no encontrando cambios en este valor entre las ratas S y E ([Figura 19A](#)). Sabiendo que las mitocondrias no estaban más alejadas entre sí, los cambios cualitativos que observábamos debían deberse a cambios en la distribución de estas. De las tres estrategias implementadas, la cantidad de vecinos y la GSE (9) fueron significativamente menores en las ratas entrenadas ([Figura 19B y 19D](#)). Respecto a la cantidad de clusters por campo, si bien la diferencia entre los grupos no fue significativa, siempre resultaron en valores menores para las ratas E comparadas con el grupo S ([Figura 19C](#)). Por lo tanto, con estos resultados podemos concluir que las mitocondrias de las ratas E tienen menos cantidad de mitocondrias vecinas y están distribuidas más uniformemente en el cardiomiocito. Estos resultados van de la mano con lo descrito en la bibliografía para cardiomiocitos sanos, en los cuales las mitocondrias tienen un patrón de distribución discreto y uniforme a lo largo de la célula ¹³¹.

Una unidad energética intracelular (UEI) es una unidad estructural y funcional de las células de músculo estriado que consiste en las mitocondrias localizadas entre las líneas Z de los sarcómeros que interactúan con las miofibrillas circundantes y con enzimas del retículo sarcoplasmático, citoesqueleto y citosol ²³⁹. Con los resultados discutidos anteriormente se podría pensar que si las mitocondrias tienen menos vecinas la difusión del ATP en las UEI sería más eficiente. Ya que, si una mitocondria se encontrase rodeada por muchas otras, cabría esperar que el ATP producido por esta tarde más en llegar a los sarcómeros perjudicando, probablemente, el acoplamiento energético-mecánico y, por lo tanto, la contracción de esa célula. Así, la distribución mitocondrial más uniforme que observamos en el miocardio de las

ratas que realizaron la rutina de entrenamiento, probablemente contribuya a la mejora que detectamos en la función contráctil de los corazones de estos animales ([Figura 14D y 14E](#)).

Limitaciones de las estrategias implementadas. Resulta importante recalcar que estos resultados fueron obtenidos en imágenes de dos dimensiones de una estructura tridimensional, por lo que sería deseable confirmarlos con otras técnicas que permitan tener una imagen más integral de la ultraestructura celular como la reconstrucción en tres dimensiones mediante tomografía electrónica. Sin embargo, en la bibliografía está ampliamente aceptada la utilización de MET para observar características morfológicas de las mitocondrias en el corazón. Para el cálculo de la GSE se utilizó una ecuación matemática ([Métodos 3.9](#)) en la cual es necesario establecer la cantidad de cuadrantes por campo a analizar. Definir esta cantidad de cuadrantes exige un equilibrio entre: 1) definir muy pocos y perder potencia de análisis por tener todas las mitocondrias dentro de unos pocos cuadrantes; y 2) definir muchos cuadrantes y que estos tengan un tamaño similar al área de las mitocondrias -teniendo muy pocas mitocondrias por cuadrante-. Según lo descrito por Kam et al ²⁰⁵, la GSE tiene una potencia de análisis que es inversamente proporcional a la cantidad de cuadrantes, siendo la mejor con 9 o 16 cuadrantes dependiendo si el número de partículas es alto o bajo, respectivamente. En este trabajo se evaluó la GSE en campos con una cantidad aproximada de 50 mitocondrias, valor intermedio de partículas, y cómo variaba la GSE modificando la cantidad de cuadrantes. Como se observa en el resultado de GSE (Figura X) la potencia de esta estrategia para 9 cuadrantes es capaz de encontrar diferencias significativas entre los grupos experimentales y para 16 cuadrantes hay una fuerte tendencia ($p=0.06$) a disminuir en las ratas del grupo E.

5.5 Entrenamiento aeróbico y la función mitocondrial

Habiendo observado cambios en la ultraestructura del cardiomiocito de las ratas entrenadas y siguiendo con la hipótesis de que esto promovería una mejor eficiencia

de la utilización energética por parte de las UEI, la función mitocondrial debería verse favorecida por el entrenamiento aeróbico para poder cumplir con la demanda de ATP. Por esto, evaluamos no solo la integridad mitocondrial a través de la cuantificación del contenido de CytC en las mitocondrias, que se veía aumentado ([Figura 21C](#)), sino que también la capacidad metabólica oxidante a través de la actividad y expresión de la CS. Encontramos un aumento de la actividad de esta enzima del ciclo de Krebs, sin cambios en su expresión ([Figura 22](#)). El aumento de la actividad, quizás por una modificación postraduccional, podría indicar un aumento en el metabolismo oxidativo por parte de estas mitocondrias, al tener un ciclo de Krebs más activo se producirían más moléculas de NADH y FADH₂ y, por lo tanto, más de estos sustratos ingresarían a la cadena de transporte de electrones para producir más ATP. Sin embargo, estas modificaciones postraduccionales en la CS no pudieron ser investigadas durante este trabajo de tesis doctoral.

Por otro lado, con relación al manejo de Ca²⁺ no encontramos diferencias significativas en el hinchamiento de la matriz mitocondrial inducido por Ca²⁺ ([Figura 27](#)) ni tampoco en la CRC o en el CCM ([Figura 28](#)) en el grupo E comparado con el S. Además, tampoco encontramos cambios en la expresión relativa del NCLX ([Figura 32](#)). Lo que probablemente indique que el manejo de Ca²⁺, al menos a nivel mitocondrial no se ve modificado por el entrenamiento, sin embargo, sigue existiendo una sobrecarga de trabajo, que produce que haya más Ca²⁺ en el citosol durante la contracción. Si este Ca²⁺ entrase a la mitocondria para activarla y producir energía probablemente también salga durante la sístole mediante aperturas cortas y transitorias del mPTP, haciendo que el balance neto en la mitocondria se mantenga sin cambios.

Por su parte, respecto a la composición lipídica en las mitocondrias, no detectamos cambios como consecuencia del entrenamiento ([Figura 26B](#)), lo que da pie a pensar que el ejercicio no afectaría las vías de síntesis lípidos ni su traslocación a mitocondria. Sin embargo, este aspecto no se estudió más en profundidad en esta tesis. Además, tampoco modifica la relación entre los lípidos formadores de bicapa y los no formadores ([Figura 26C](#)), es decir que la curvatura y estructuras de las

crestas mitocondriales per se no se verían modificadas por las especies lipídicas presentes en las membranas. Resulta interesante, que el daño oxidativo a estos lípidos mitocondriales se vio disminuido en las ratas E ([Figura 26D](#)). Lo que, en primer lugar, refuerza los resultados obtenidos relacionados al menor estrés oxidativo en el corazón y, en segundo lugar, podría ser un indicio de que las mitocondrias en las ratas E serían nuevas mitocondrias.

Por otra parte, la O-GlcNAc de las proteínas consiste en el agregado en sitios Ser/Thr de N-Acetilglucosamina, por lo puede competir con sitios de fosforilación. Esta modificación postraducciona es dependiente del estado metabólico celular y está asociada con la regulación de función, interacción proteína-proteína, localización subcelular y actividad enzimática ²⁴⁰. Esta modificación se encuentra en proteínas nucleares, citosólicas y mitocondriales y está regulada por dos proteínas: OGT y OGA, las cuales se encarga de remover o añadir el grupo respectivamente. Los niveles altos de O-GlcNAc están asociados con el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares ²⁴¹. En esta tesis se estudiaron solamente los niveles de O-GlcNAc en la fracción mitocondrial por ser el eje principal. No encontramos cambios significativos en la expresión de estas proteínas ([Figura 29B y 29C](#)), pero sí una reducción de los niveles de esta modificación postraducciona en el grupo E ([Figura 29A](#)), lo que indicaría que quizás exista un mecanismo postraducciona sobre OGT y/o OGA. Una de las principales reguladoras de estas enzimas es AMPK, sin embargo, el no haber encontrado cambios en la activación de estas enzima, en principio pondría en duda su rol consecuencia del entrenamiento. Por otro lado, resulta interesante que a nivel vascular se ha asociado la O-GlcNAc de AKT como un mecanismo perjudicial para la producción de NO y la angiogénesis ^{241,242}. Además, durante el ejercicio está demostrado que la activación de AKT es un eslabón crucial para la cardioprotección, por lo que podría esperarse que exista algún vínculo entre el ejercicio y la disminución de O-GlcNAc a nivel cardíaco que no fue estudiado en esta tesis y que requiere la realización de nuevos experimentos para dilucidarlo.

Por último, encontramos que las mitocondrias de las ratas E tienen un mayor ΔpH y $\Delta\Psi_m$ ([Figura 23](#)), ambos factores de relevancia para la producción de ATP. No

obstante, y contrario a lo que esperábamos, encontramos una tendencia a presentar un menor coeficiente respiratorio ([Figura 24](#)) en las mitocondrias de las ratas E. Esto nos plantea la posibilidad de al menos dos escenarios distintos: 1) las mitocondrias de los corazones de las ratas E efectivamente producen menos ATP porque tienen menor consumo de O₂ o 2) las mitocondrias de ese mismo grupo están más acopladas que las de las ratas S y, por lo tanto, el consumo de O₂ es más eficiente, traduciéndose en una mayor producción de ATP. Para intentar vislumbrar el segundo escenario se estudió la expresión del intercambiador NHE-1 en la fracción mitocondrial, este intercambiador puede fungir como un desacoplante de la CTE, ya que promueve el intercambio de un Na⁺ desde la matriz por un H⁺ desde el espacio intermembrana y, de esta forma, reducir la FPM. No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos ([Figura 32](#)) lo que sugiere que, al menos este mecanismo no es responsable por la diferencia parcial en el coeficiente respiratorio. Finalmente, y para determinar si todas las adaptaciones mitocondriales miocárdicas del grupo entrenado hasta aquí descritas, efectivamente se traducían en una mayor producción energética por un mejor acople de las mitocondrias, evaluamos el contenido y producción de ATP, encontrando a ambos significativamente aumentados ([Figura 25](#)). Por lo tanto, entendemos que queda demostrado que independientemente del nivel de Ca²⁺ en estas organelas y la composición lipídica, las mitocondrias producen más energía ([Figura 25](#)), posiblemente porque presentan una mayor FPM ([Figura 23](#)) y un menor estrés oxidativo ([Figura 31](#)), entre otros factores.

5.6 El entrenamiento aeróbico promueve un mecanismo de restauración mitocondrial

Luego de las 8 semanas de entrenamiento las ratas del grupo E mostraron un aumento de la cantidad de copias de ADNmt respecto a las ratas S ([Figura 20](#)). Esto implicaría un aumento en la cantidad de mitocondrias inducido por el entrenamiento, aunque este resultado no es acompañado por los obtenidos de la microscopía electrónica de transmisión ([Figura 18](#)). Estos últimos son obtenidos de una región

específica de la célula, mientras que el ADNmt es proveniente de todas las subpoblaciones mitocondriales de las células; además, que la sensibilidad de ambos métodos es distinta; y esto podría ser la razón de que los resultados no coincidan.

Trabajos *in vitro* demostraron que un mecanismo dependiente de NOX2/ROS promueve una disminución del ADNmt en cultivo de cardiomiocitos primarios, en ese caso particular, expuestos a aldosterona ²⁴³. Por lo que nuestros resultados permitirían postular que el entrenamiento aeróbico podría estimular la producción de nuevas mitocondrias, al menos en parte, al disminuir el estrés oxidativo.

Como fue mencionado anteriormente, el fenotipo mitocondrial está regulado por cuatro procesos principales: biogénesis, fisión, fusión y mitofagia. En los estudios de qPCR encontramos que los niveles de ARNm de los principales marcadores de estos procesos se veían afectados. La revisión de la bibliografía en este aspecto sugiere que los cambios observados en estos procesos suelen ser dependientes de los modelos y las intervenciones utilizadas ²⁴⁴⁻²⁴⁷. Nuestros resultados indican que el entrenamiento favorece la disminución de la fusión entre mitocondrias, sugiriendo que las mitocondrias presentes no estarían uniéndose entre sí para poder rescatar su correcto funcionamiento. En su lugar, estarían fisionándose más para producir mitocondrias nuevas -una funcional y otra disfuncional- ^{101,112,248}. La mitocondria disfuncional podría estar siendo degradada por mitofagia, como lo marca el aumento en su marcador. Por último, observamos también un aumento en los niveles del marcador de biogénesis mitocondrial ([Figura 20](#)), PGC1- α , por lo que la producción de estas organelas nuevas, funcionales, podría estar contribuyendo a mejorar el fenotipo mitocondrial. Por lo tanto, nosotros postulamos que el entrenamiento genera cambios duraderos en el fenotipo mitocondrial a través de un mecanismo de restauración, promoviendo que las mitocondrias se fisionen, obteniéndose una mitocondria más funcional y otra más disfuncional ([Figura 20](#)). Esta última es enviada a su eliminación por la maquinaria de mitofagia. Además, también se pone en juego el incremento en la producción de mitocondrias nuevas.

Mecanismos similares al propuesto se encuentran descritos para el músculo esquelético y el miocardio en modelos de envejecimiento sometidos a un plan de

ejercicio. Allí, este proceso de restauración va ayudando a “limpiar” y mejorar el fenotipo mitocondrial de forma progresiva²⁴⁹. Por lo tanto, es posible especular que, a mayor duración del protocolo de entrenamiento, más efectiva podrá ser la restauración mitocondrial. También resulta importante recordar que la hipertensión en estos animales sigue estando presente, es decir que, si el estímulo de entrenamiento cesa es muy probable que el fenotipo mitocondrial vuelva a perjudicarse. Lamentablemente, en este trabajo de tesis doctoral no se evaluaron estas hipótesis y, por lo tanto, futuros estudios son necesarios para poder corroborarla.

El aumento de PGC1- α podría también contribuir a explicar el aumento en el número de copias de ADNmt encontrado en las ratas E, porque favorece la transcripción²⁵⁰. Interesantemente, este marcador está también propuesto como un regulador maestro de la función y supervivencia celular, al disminuir la producción ROS y estimular la función mitocondrial²⁵¹⁻²⁵⁴. Esto postula a PGC1- α como un jugador crítico en las adaptaciones beneficiosas inducidas por el entrenamiento.

5.7 Vías responsables de las adaptaciones al entrenamiento aeróbico

Con el fin de dilucidar las posibles vías de señalización intracelular responsables de las adaptaciones inducidas por el entrenamiento hasta ahora vistas y, sabiendo que el IGF-1 en plasma aumenta durante la realización de ejercicio, evaluamos la expresión y fosforilación de su receptor, IGF1R. No encontramos cambios en estos aspectos ([Figura 33A y 33B](#)), quizás debido al comportamiento pulsátil del IGF-1, es decir que la activación del receptor ocurre solamente cuando el animal está ejercitándose y una vez finaliza el ejercicio los niveles de IGF-1 disminuyen²⁵⁵. La vía canónica de este receptor es la de PI3K/AKT, una vía de quinasas cardioprotectora, por lo que el segundo paso fue evaluar la expresión de AKT y su activación por fosforilación. Encontramos un aumento de la fosforilación, pero no de la expresión total de AKT, indicando que existe una activación de la vía canónica *downstream* de IGF1R ([Figura 33C y 33D](#)).

Por otro lado, se evaluó la expresión y fosforilación de AMPK en el sitio Thr-172. Esta quinasa está descrita que aumenta su activación durante el ejercicio ya que es un sensor energético y metabólico ^{251,256}. Cuando existe un aumento de AMP por aumento de la demanda energética esta quinasa estimula vías de producción de ATP, esto la convierte en un sensor agudo del estado energético celular. En nuestro modelo experimental no encontramos cambios ni en la expresión ni en la fosforilación de AMPK ([Figura 33E y 33F](#)). Esto quizás se deba a dos motivos: 1) que el modelo de entrenamiento es crónico y no agudo y 2) que al momento de la recolección de muestra los animales no estaban entrenando y, por lo tanto, en ese momento no existía un aumento en la demanda energética. Sin embargo, no podemos descartar la activación de AMPK durante la realización del ejercicio, y que esta contribuya a los efectos beneficiosos encontrados.

Asimismo, estudiamos la expresión de calcineurina y de los transportadores iónicos NHE-1, NCX y NBCe1, todos asociados a las vías prohipertroóficas patológicas. No encontramos cambios en la expresión de ninguna de estas proteínas ([Figura 33I, 32A, 32B y 32C](#)). Respecto al NHE-1 está descrito que su expresión no cambia en la hipertrofia patológica pero sí su activación por fosforilación en el sitio Ser703 consecuencia de p90RSK ²⁵⁷. Si bien en esta tesis no se estudió este último aspecto, trabajos previos de nuestro grupo demostraron que la vía IGF-1/AKT es responsable de fosforilarlo en el sitio Ser648 disminuyendo la hiperactividad del intercambiador y promoviendo efectos cardioprotectores ^{61,85}. Por lo tanto, cabría esperar que la fosforilación inhibitoria esté presente y, en consecuencia, no exista la sobrecarga de Na⁺ que produce la sobrecarga de Ca²⁺ por activación del modo NCX_{rev} y posterior activación de calcineurina ([Figura 2](#)). Por otro lado, la inhibición de NBCe1 conduce al desarrollo de hipertrofia cardíaca ²⁹, mientras que su sobreexpresión acorta el potencial de acción y no induce hipertrofia ³⁰. Por lo tanto, al no haber detectado cambios en la expresión del NBCe1 en las ratas E resulta necesario realizar nuevos experimentos que evalúen la actividad del cotransporte para completar el estudio de un posible efecto del entrenamiento sobre el mismo.

Adicionalmente, la vía apelina/APJ también ha sido demostrado que aumenta durante el ejercicio ¹⁹⁶, por lo que evaluamos la expresión de ARNm de ambos componentes y la proteica de APJ en nuestro modelo, encontrando un aumento en todas ellas ([Figura 34](#)). También está descrito que apelina activa la vía cardioprotectora PI3K/AKT ¹⁹³. Por lo que, por ahora, no podemos dilucidar si los resultados del aumento de la fosforilación de AKT provienen de la activación de la vía IGF-1/IGF1R y/o apelina/APJ.

GSK3 β es una serina/treonina quinasa y su actividad está vinculada con diversas patologías que cursan con disfunción mitocondrial como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson ²⁵⁸. La activación de esta quinasa fosforila a la ciclofilina D y promueve la apertura del mPTP ²⁵⁹, lo que puede llegar a ser perjudicial para la función mitocondrial. Uno de los blancos *downstream* de AKT es GSK3 β al que fosforila en el sitio Ser9 inhibiendo su translocación a la mitocondria y su actividad ²⁶⁰. Nuestros resultados van de la mano con lo propuesto por otros grupos, encontramos que el entrenamiento produjo un aumento en la fosforilación de Ser9 de GSK3 β sin cambios en su expresión ([Figura 33G y 33H](#)). Además, ha sido demostrado, en músculo esquelético, que la inactivación de GSK3 β promueve el metabolismo oxidativo y la activación y expresión de PGC1- α ^{261,262}.

Considerando estos resultados nosotros proponemos que el entrenamiento promueve la activación de la vía de IGF-1/IGF1R y de apelina/APJ y que estas podrían converger en AKT, la cual fosforilaría e inhibiría a GSK3 β , lo que promovería la estabilización de PGC1- α y la mejora de la función mitocondrial ([Figura 39](#)).

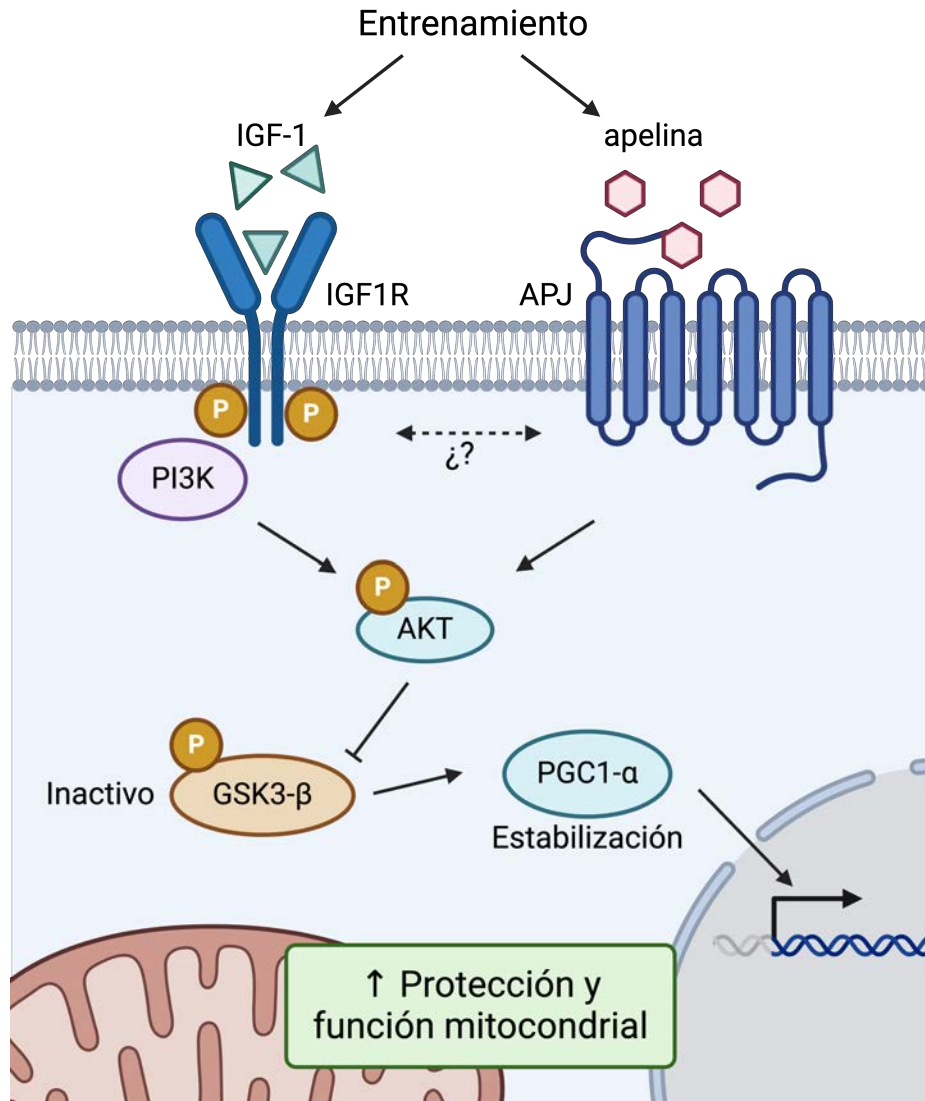


Figura 39. Esquema de la vía de señalización intracelular propuesta en esta tesis doctoral. Entrenamiento/IGF-1+apelina/IGF1R+APJ/AKT/GSK3-β/PGC1-α.

Con el objetivo de dilucidar si las vías de IGF-1 y apelina comparten el mismo camino de señalización se realizaron los experimentos *in vitro* en cardiomiocitos aislados de SHR verificando algunos de los efectos vistos hasta ahora -balance redox y función mitocondrial-. Primero, decidimos trabajar con un estímulo pro-oxidante para la célula que no fuera tan perjudicial como para producir la muerte de la célula, por lo que realizamos una curva dosis respuesta de producción de ROS vs. concentración de H₂O₂ y elegimos la concentración de 25 μM (Figura 35). Segundo, para evaluar los efectos protectores de IGF-1 los cardiomiocitos fueron expuestos en

agudo al estímulo oxidante y también a un estímulo desacoplantes en presencia o ausencia del antagonista de su receptor: AG1024. El hecho que IGF-1 no haya modificado la producción basal -sin estímulo- de ROS ([Figura 36A](#)) es importante porque diversas vías de comunicación intracelular dependen de pequeñas cantidades de ROS como intermediarias. Ante la presencia del estímulo oxidante, IGF-1 fue capaz de prevenir el aumento en la producción de ROS y al incubar las células con AG1024 este efecto se vio cancelado ([Figura 36B](#)). Este resultado refuerza lo publicado previamente por nuestro y grupo y otros ^{85,263,264}. Sin embargo, cuando se trataron las células con el desacoplante mitocondrial en una concentración que no despolariza por completo las mitocondrias, FCCP 500 nM, observamos que no hubo un aumento en la producción de ROS en ninguno de los grupos ([Figura 36C](#)). Estos resultados van de la mano con los obtenidos en mitocondrias aisladas de las ratas S, donde la despolarización con FCCP disminuyó la producción de ROS ([Figura 31](#)). Probablemente esto se deba a que la CTE de las mitocondrias de las ratas hipertensas está saturada y, por lo tanto, produce ROS por un flujo retrógrado de electrones ([Figura 7](#)); y cuando se desacoplan las mitocondrias no existe más el flujo retrógrado y la producción de ROS cesa. De todas formas, esta hipótesis requiere la realización de nuevos experimentos para ser comprobada. Tercero, con el fin de evaluar si el IGF-1 en agudo tenía efectos directos sobre las mitocondrias evaluamos el $\Delta\Psi_m$ en presencia o ausencia de AG1024 y en este caso se utilizaron como desafíos: un oxidante (H_2O_2 25 μM) y un desacoplante en dos concentraciones para producir una despolarización mitocondrial leve (FCCP 500 nM) y una mayor (FCCP 5 μM). Como se puede observar en la Figura 37, el IGF-1 en presencia o ausencia de AG1024 no produjo protección mitocondrial frente a los desacoplantes ([Figura 37](#)). Estos resultados sugieren que el IGF-1 en agudo no tiene un efecto directo en las mitocondrias, sino que probablemente sea un efecto indirecto al disminuir el estrés oxidativo en las células.

Posteriormente, para evaluar si IGF-1 y apelina son eslabones de una misma vía se realizaron experimentos cuantificando la producción de ROS y el $\Delta\Psi_m$ nuevamente. En esta ocasión optamos por aplicar un desafío oxidante mayor -para lograr despolarizar las mitocondrias- ya que no podemos descartar que

anteriormente no se haya observado un efecto a nivel mitocondrial debido a que el estímulo oxidante fue leve y no comprometió a las mitocondrias. La presencia de IGF-1 disminuyó la producción de ROS y la presencia de AG1024 bloqueó ese efecto, corroborando los resultados previos (Figura 38A). La presencia de apelina de forma muy similar a IGF-1 disminuyó la producción de ROS y la presencia de ML221, antagonista de APJ, evitó el efecto antioxidante (Figura 38B). Sorprendentemente, cuando se incubaron los cardiomiocitos con IGF-1 + ML221 o con apelina + AG1024, los efectos antioxidante de ambas moléculas también se vieron bloqueados. Cuando se evaluó $\Delta\Psi_m$ se obtuvieron resultados análogos, es decir, tanto IGF-1 como apelina evitaron la caída de $\Delta\Psi_m$ frente al estímulo oxidante más fuerte y la presencia de los antagonistas respectivos de sus receptores bloqueó estos efectos ([Figura 38C y 38D](#)). Además, también la presencia de los inhibidores cruzados evitó el efecto protector sobre las mitocondrias. Estos resultados sugieren que la protección de IGF-1 y apelina probablemente sea por efectos antioxidantes y no por un efecto directo sobre la mitocondria; y, quizás más interesantemente, que ambos receptores podrían estar interactuando entre sí, ya que la inhibición de uno o del otro bloquea el efecto del agonista contrario, es decir ML221 bloquea al efecto de IGF-1 y AG1024 bloquea a apelina. Hipotéticamente, quizás ocurra alguna heterodimerización entre los receptores que amplifique la señal de la vía; tal como fue descrito para el receptor APJ con distintos tipos de receptores acoplados a proteínas G y para el IGF1R con el receptor de insulina (otro receptor tirosinquinasa)²⁶⁵⁻²⁶⁷. Sin embargo, también ha sido descrita la transactivación de receptores acoplados a proteínas G con receptores tirosinquinasa²⁶⁸⁻²⁷⁰. Esto abre la posibilidad de que estos receptores estén colocalizados en dominios específicos de membrana y la activación de uno produzca la activación del otro por interacción directa o por moléculas que funjan como segundos mensajeros bidireccionales. Sin embargo, más experimentos son necesarios para poder dilucidar el mecanismo exacto de la interrelación entre IGF1R y APJ.

5.8 Conclusiones parciales

Considerando los resultados descritos que fueron obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral, podemos concluir que:

- A. El protocolo de natación de 8 semanas de duración fue suficiente para producir el entrenamiento de los animales, sin provocarles estrés de manera crónica.
- B. El entrenamiento fue capaz de evitar el incremento de la PAS causado por la edad y mejoró la estructura del corazón junto con la función de bomba.
- C. El entrenamiento, en línea con publicaciones anteriores de nuestro grupo, promovió modificaciones en la matriz extracelular del miocardio con modificaciones en los niveles de expresión de MMP2 y CTGF.
- D. El protocolo de entrenamiento redujo los niveles de ANP y parcialmente los de β -MHC, indicando una regresión del fenotipo patológico y probablemente una conversión al fisiológico al mantener la masa y mejorar la función cardíacas.
- E. Respecto al balance redox, éste se vio mejorado al disminuir la producción de ROS, tanto a nivel global del tejido como a nivel mitocondrial, y aumentar la actividad de la enzima catalasa en las ratas que cumplieron con la rutina de natación.
- F. El entrenamiento fue capaz de mejorar el desarreglo entre la red mitocondrial y la sarcomérica presente en el miocardio hipertrófico de origen hipertensivo, al disminuir la cantidad de vecinos que cada mitocondria tiene -es decir reduciendo su agrupamiento- y promoviendo una distribución más uniforme en el cardiomiocito.
- G. Conjuntamente, el entrenamiento también fue capaz de mejorar la función mitocondrial en diversos aspectos: mejoró el $\Delta\Psi_m$, el ΔpH , la eficiencia en el consumo de O_2 y aumentó la producción y contenido de ATP.
- H. Las modificaciones beneficiosas en la función mitocondrial parecieran ser independientes del manejo de Ca^{2+} y de la composición lipídica

mitocondrial. Aunque quizás favorecida en alguna medida por disminución de los niveles de O-GlcNAc en la fracción mitocondrial.

- I. Además, la rutina de natación promovió un mecanismo de restauración mitocondrial, evidenciado por cambios en los principales marcadores de los distintos procesos que regulan la dinámica mitocondrial. Aumentó la biogénesis, la fisión y la mitofagia, mientras que disminuyó la fusión mitocondrial.
- J. La vía de señalización celular responsable, al menos en parte, de los cambios beneficiosos parecería ser la mediada por IGF1R+APJ/AKT/GSK3- β /PGC1- α . Mientras que no resulta evidente que aquella dependiente de AMPK sea responsable de los cambios observados en este modelo de ejercicio crónico.
- K. Según los resultados de los experimentos *in vitro*, demostramos que la incubación aguda de cardiomiocitos aislados de ratas SHR con IGF-1 es capaz de reducir el estrés oxidativo provocado por exposición a concentraciones moderadas de H₂O₂ 25 μ M, aunque no disminuye la producción celular basal de ROS. Este último aspecto es de suma importancia porque pequeñas cantidades de ROS son necesarias para muchas vías intracelulares de la señalización celular fisiológica.
- L. La incubación aguda de cardiomiocitos aislados de SHR con IGF-1 no evitó la despolarización mitocondrial leve ni severa inducida exposición al desacoplante químico FCCP. Sin embargo, frente un estímulo oxidante más fuerte, H₂O₂ 100 μ M, hubo protección por parte tanto de IGF-1 como de apelina. Probablemente, los efectos protectores del ejercicio mediados por IGF-1 o apelina se deban a evitar la liberación de ROS inducida por ROS y no por un efecto agudo directo sobre la mitocondria.
- M. La incubación con IGF-1 en presencia de ML221 o apelina en presencia de AG1024 sugieren una interrelación de ambas vías, probablemente a nivel de los receptores y seguramente a través de la convergencia en la vía de AKT.

5.9 Conclusión

El entrenamiento aeróbico surge como una alternativa no farmacológica eficiente y de bajo costo para promover la transformación de la hipertrofia cardíaca patológica inducida por hipertensión arterial, hacia un fenotipo fisiológico; y, de esta forma, posiblemente, enlentecer o evitar la progresión a la insuficiencia cardíaca.

Como lo demostramos en esta tesis, el beneficio se logra a través de la activación de vías cardioprotectoras - IGF1R+APJ/AKT/GSK3- β /PGC1- α - que permiten al corazón afrontar en mejores condiciones la sobrecarga hemodinámica, tanto de la hipertensión como del ejercicio aeróbico. Estas vías no solo mejoran el estado redox, disminuyendo la producción de ROS y promoviendo los sistemas antioxidantes, sino que también tienen efectos sobre otros aspectos de las mitocondrias cardíacas. Estas organelas, que son la principal fuente de energía en el miocardio, presentan, en el marco de la hipertrofia cardíaca patológica, una sobrecarga de trabajo que puede resultar perjudicial para la bioenergética y la función de bomba del corazón. Por eso, mantener su calidad es de suma importancia para las células. Esta tesis aporta, por primera vez, datos inequívocos respecto a los efectos beneficiosos del entrenamiento aeróbico sobre las mitocondrias de corazones hipertróficos de origen hipertensivo, principalmente por la activación de un programa de restauración mitocondrial. Se estimula la biogénesis mitocondrial - reflejado por el aumento de PGC1- α y del cociente ADNm/ADNn- y la eliminación de las mitocondrias disfuncionales al aumentar la fisión y la mitofagia (evidenciado por el aumento de DRP1 y PINK1). Como consecuencia, las mitocondrias miocárdicas presentan un mejor $\Delta\Psi_m$, ΔpH y producción de ATP. Además, como es de esperarse, no aumenta el estrés oxidativo porque las nuevas mitocondrias producen menos ROS y presentan menos peroxidación lipídica.

Otro aspecto novedoso y relevante descrito en esta tesis doctoral es que el entrenamiento aeróbico modificó la ultraestructura de los cardiomiocitos al reorganizar el entramado mitocondria/sarcómero. Esto último, sumado a la mayor producción de ATP, estaría favoreciendo el correcto funcionamiento de las UEI. El ATP producido por las mitocondrias, que en el miocardio entrenado están más

uniformemente distribuidas, puede difundir más eficientemente hacia la maquinaria sarcomérica, favoreciendo la contracción. Ello fue evidenciado por la mejora en el acortamiento medioventricular determinado por ecocardiografía.

A continuación, se presenta de forma esquemática un resumen gráfico de los efectos cardioprotectores inducidos por la rutina de entrenamiento ya descritos (Figura 40).

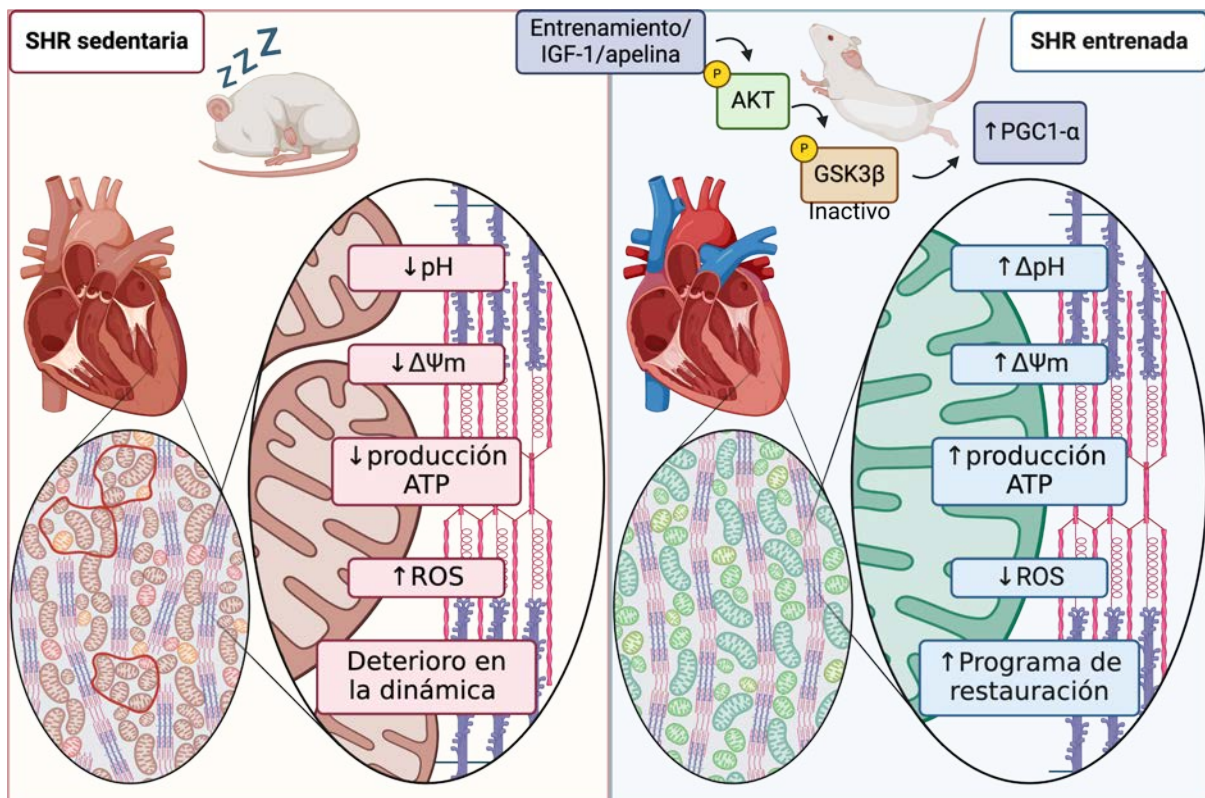


Figura 40. Resumen gráfico de los principales resultados obtenidos en esta tesis doctoral.

6. Bibliografía

1. Saxena, T., Ali, A. O. & Saxena, M. Pathophysiology of essential hypertension: an update. <https://doi.org/10.1080/14779072.2018.1540301> **16**, 879–887 (2018).
2. Messerli, F. H., Williams, B. & Ritz, E. Essential hypertension. *The Lancet* **370**, 591–603 (2007).
3. Al Ghorani, H., Götzinger, F., Böhm, M. & Mahfoud, F. Arterial hypertension – Clinical trials update 2021. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **32**, 21–31 (2022).
4. Padmanabhan, S., Aman, A. & Dominiczak, A. F. Genomics of hypertension. *Pharmacol Res* **121**, 219–229 (2017).
5. Hart, E. C. & Charkoudian, N. Sympathetic neural mechanisms in human blood pressure regulation. *Curr Hypertens Rep* **13**, 237–243 (2011).
6. Rodriguez-Iturbe, B., Romero, F. & Johnson, R. J. Pathophysiological mechanisms of salt-dependent hypertension. *Am J Kidney Dis* **50**, 655–672 (2007).
7. Cooper, S. A. *et al.* Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, (2007).
8. Duprez, D. A. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *J Hypertens* **24**, 983–991 (2006).
9. Brouwers, S., Sudano, I., Kokubo, Y. & Sulaica, E. M. Arterial hypertension. *The Lancet* **398**, 249–261 (2021).
10. Forouzanfar, M. H. *et al.* Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990–2015. *JAMA* **317**, 165–182 (2017).
11. Espeche, W. *et al.* Adherence to antihypertensive drug treatment in Argentina: A multicenter study.

- J Clin Hypertens (Greenwich)* **22**, 656–662 (2020).
12. Kjeldsen, S. E. Hypertension and cardiovascular risk: General aspects. *Pharmacol Res* **129**, 95–99 (2018).
 13. Burnier, M. & Egan, B. M. Adherence in Hypertension. *Circ Res* **124**, 1124–1140 (2019).
 14. Garcia-Hermoso, A. *et al.* Adherence to aerobic and muscle-strengthening activities guidelines: A systematic review and meta-analysis of 3.3 million participants across 32 countries. *Br J Sports Med* **57**, 225–229 (2023).
 15. Porrello, E. R. *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science (1979)* **331**, 1078–1080 (2011).
 16. Soonpaa, M. H. & Field, L. J. Survey of Studies Examining Mammalian Cardiomyocyte DNA Synthesis. *Circ Res* **83**, 15–26 (1998).
 17. Nakamura, M. & Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* **15**, 387–407 (2018).
 18. Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine. **982**, (2017).
 19. Dalrymple, A., Mahn, K., Poston, L., Songu-Mize, E. & Tribe, R. M. Mechanical stretch regulates TRPC expression and calcium entry in human myometrial smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod* **13**, 31–39 (2007).
 20. Streiff, M. E., Corbin, A. C., Ahmad, A. A., Hunter, C. & Sachse, F. B. TRPC1 channels underlie stretch-modulated sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiomyocytes. *Front Physiol* **13**, (2022).
 21. Cingolani, H. E., Ennis, I. L., Aiello, E. A. & Pérez, N. G. Role of autocrine/paracrine mechanisms in response to myocardial strain. *Pflugers Arch* **462**, 29–38 (2011).
 22. Cingolani, H. E., Pérez, N. G., Cingolani, O. H. & Ennis, I. L. The Anrep effect: 100 years later. *Am*

- J Physiol Heart Circ Physiol* **304**, (2013).
23. Cingolani, H. E., Aiello, E. A., Pérez, N. G., Ennis, I. L. & Hurtado, M. C. C. de. The Na⁺/H⁺ Exchanger as the Main Protagonist following Myocardial Stretch: The Anrep Effect and Myocardial Hypertrophy. *Mechanosensitivity in Cells and Tissues* (2005).
 24. Caldiz, C. I. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium. *J Physiol* **584**, 895–905 (2007).
 25. Aiello, E. A., Villa-Abrille, M. C. & Cingolani, H. E. Autocrine stimulation of cardiac Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger currents by endogenous endothelin released by angiotensin II. *Circ Res* **90**, 374–376 (2002).
 26. Correa, M. V. *et al.* Endogenous endothelin 1 mediates angiotensin II-induced hypertrophy in electrically paced cardiac myocytes through EGFR transactivation, reactive oxygen species and NHE-1. *Pflugers Arch* **466**, 1819–1830 (2014).
 27. Cingolani, H. E. & Ennis, I. L. Sodium-Hydrogen Exchanger, Cardiac Overload, and Myocardial Hypertrophy. *Circulation* **115**, 1090–1100 (2007).
 28. Mattiazzi, A. *et al.* Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **308**, H1177–H1191 (2015).
 29. Di Mattia, R. A. *et al.* The specific inhibition of the cardiac electrogenic sodium/bicarbonate cotransporter leads to cardiac hypertrophy. *Life Sci* **312**, (2023).
 30. Di Mattía, R. A. *et al.* In vivo Overexpression of Electrogenic Sodium/Bicarbonate Cotransporter (NBCe1) by AAV9 Modifies the Cardiac Action Potential and the QT Interval in Mice. *Front Cardiovasc Med* **9**, 862118 (2022).
 31. Tsutsui, H., Kinugawa, S. & Matsushima, S. Oxidative stress

- and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, 2181–2190 (2011).
32. Seals, D. R., Nagy, E. E. & Moreau, K. L. Aerobic exercise training and vascular function with ageing in healthy men and women. *J Physiol* **597**, 4901–4914 (2019).
 33. Sharman, J. E., La Gerche, A. & Coombes, J. S. Exercise and cardiovascular risk in patients with hypertension. *Am J Hypertens* **28**, 147–158 (2015).
 34. MacInnis, M. J. & Gibala, M. J. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol* **595**, 2915–2930 (2017).
 35. Pedersen, B. K. & Saltin, B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports* **25 Suppl 3**, 1–72 (2015).
 36. Hötting, K. & Röder, B. Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* **37**, 2243–2257 (2013).
 37. Swift, D. L., Johannsen, N. M., Lavie, C. J., Earnest, C. P. & Church, T. S. The role of exercise and physical activity in weight loss and maintenance. *Prog Cardiovasc Dis* **56**, 441–447 (2014).
 38. Actividad física. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>.
 39. Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Weeks, K. L., Patterson, N. L. & McMullen, J. R. Understanding Key Mechanisms of Exercise-Induced Cardiac Protection to Mitigate Disease: Current Knowledge and Emerging Concepts. *Physiol Rev* **98**, 419–475 (2018).
 40. Eijsvogels, T. M. H., Fernandez, A. B. & Thompson, P. D. Are there deleterious cardiac effects of acute and chronic endurance exercise? *Physiol Rev* **96**, 1–2 (2016).

41. Eijsvogels, T. M. H., Thompson, P. D. & Franklin, B. A. The “Extreme Exercise Hypothesis”: Recent Findings and Cardiovascular Health Implications. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* **20**, 1–11 (2018).
42. Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Berger, N. A. & Lucia, A. Exercise is the real polypill. *Physiology* **28**, 330–358 (2013).
43. Tanasescu, M. *et al.* Exercise Type and Intensity in Relation to Coronary Heart Disease in Men. *JAMA* **288**, 1994–2000 (2002).
44. Sharalaya, Z. & Phelan, D. Cardiac risk of extreme exercise. *Sports Med Arthrosc Rev* **27**, E1–E7 (2019).
45. Sequeira, V. & van der Velden, J. Historical perspective on heart function: the Frank-Starling Law. *Biophys Rev* **7**, 421–447 (2015).
46. Maack, C. & O’Rourke, B. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol* **102**, 369–392 (2007).
47. Kohlhaas, M., Nickel, A. G. & Maack, C. Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *J Physiol* **595**, 3753–3763 (2017).
48. Kwong, J. Q. *et al.* The Mitochondrial Calcium Uniporter Selectively Matches Metabolic Output to Acute Contractile Stress in the Heart. *Cell Rep* **12**, 15–22 (2015).
49. Bertero, E. *et al.* Loss of Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Limits Inotropic Reserve and Provides Trigger and Substrate for Arrhythmias in Barth Syndrome Cardiomyopathy. *Circulation* **144**, 1694–1713 (2021).
50. Hong, S. *et al.* Role of the calcium sensing receptor in cardiomyocyte apoptosis via mitochondrial dynamics in compensatory hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* **487**, 728–733 (2017).

51. Litviňuková, M. *et al.* Cells of the adult human heart. *Nature* 2020 588:7838 **588**, 466–472 (2020).
52. Zernecke, A., Bernhagen, J. & Weber, C. Macrophage Migration Inhibitory Factor in Cardiovascular Disease. *Circulation* **117**, 1594–1602 (2008).
53. Moskalik, A., Niderla-Bielińska, J. & Ratajska, A. Multiple roles of cardiac macrophages in heart homeostasis and failure. *Heart Failure Reviews* 2021 27:4 **27**, 1413–1430 (2021).
54. Zhou, P. & Pu, W. T. Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* **118**, 368–370 (2016).
55. Tang, Y., Nyengaard, J. R., Andersen, J. B., Baandrup, U. & Gundersen, H. J. G. The application of stereological methods for estimating structural parameters in the human heart. *Anatomical Record* **292**, 1630–1647 (2009).
56. Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* **128**, 191–227 (2010).
57. Xiao, J. *et al.* Exercise-induced physiological hypertrophy initiates activation of cardiac progenitor cells. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 663 (2014).
58. Senyo, S. E. *et al.* Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 2012 493:7432 **493**, 433–436 (2012).
59. Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* (1979) **324**, 98–102 (2009).
60. Bei, Y. *et al.* Cardiac cell proliferation is not necessary for exercise-induced cardiac growth but required for its protection against ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med* **21**, 1648–1655 (2017).
61. Yeves, A. M. *et al.* Physiological cardiac hypertrophy: critical role of AKT in the prevention of NHE-

- 1 hyperactivity. *J Mol Cell Cardiol* **76**, 186–195 (2014).
62. Wilson, M. G., Ellison, G. M. & Cable, N. T. Basic science behind the cardiovascular benefits of exercise. *Heart* **101**, 758–765 (2015).
 63. Bekhite, M. M. *et al.* VEGF-mediated PI3K class IA and PKC signaling in cardiomyogenesis and vasculogenesis of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* **124**, 1819–1830 (2011).
 64. Heinonen, I. *et al.* Myocardial blood flow and its transit time, oxygen utilization, and efficiency of highly endurance-trained human heart. *Basic Res Cardiol* **109**, 1–13 (2014).
 65. Garcarena, C. D. *et al.* Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* **53**, 708–714 (2009).
 66. Balligand, J. L., Feron, O. & Dessy, C. eNOS activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* **89**, 481–534 (2009).
 67. Manoury, B., Montiel, V. & Balligand, J. L. Nitric oxide synthase in post-ischaemic remodelling: new pathways and mechanisms. *Cardiovasc Res* **94**, 304–315 (2012).
 68. Tejero, J., Shiva, S. & Gladwin, M. T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev* **99**, 311–379 (2019).
 69. Calvert, J. W. *et al.* Exercise Protects Against Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury via Stimulation of β 3-Adrenergic Receptors and Increased Nitric Oxide Signaling: Role of Nitrite and Nitrosothiols. *Circ Res* **108**, 1448–1458 (2011).
 70. Calvert, J. W. & Lefer, D. J. Role of β -adrenergic receptors and nitric oxide signaling in exercise-mediated cardioprotection. *Physiology* **28**, 216–224 (2013).

71. Couchonnal, L. F. & Anderson, M. E. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology* **23**, 151–159 (2008).
72. Mollova, M. Y., Katus, H. A. & Backs, J. Regulation of CaMKII signaling in cardiovascular disease. *Front Pharmacol* **6**, 154843 (2015).
73. Kemi, O. J. *et al.* Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* **43**, 354–361 (2007).
74. Yang, K. C. *et al.* Homeostatic regulation of electrical excitability in physiological cardiac hypertrophy. *J Physiol* **588**, 5015–5032 (2010).
75. Yang, K. C., Jay, P. Y., McMullen, J. R. & Nerbonne, J. M. Enhanced cardiac PI3K α signalling mitigates arrhythmogenic electrical remodelling in pathological hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* **93**, 252–262 (2012).
76. Ma, M. *et al.* Aerobic exercise ameliorates cardiac hypertrophy by regulating mitochondrial quality control and endoplasmic reticulum stress through M2AChR. *J Cell Physiol* **236**, 6581–6596 (2021).
77. Crisman, R. P. & Tomanek, R. J. Exercise training modifies myocardial mitochondria and myofibril growth in spontaneously hypertensive rats. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1985.248.1.H8> **17**, (1985).
78. Mattfeldt, T., Krämer, K. L., Zeitz, R. & Mall, G. Stereology of myocardial hypertrophy induced by physical exercise. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **409**, 473–484 (1986).
79. Arcos, J. C., Sohal, R. S., Sun, S. C., Argus, M. F. & Burch, G. E. Changes in ultrastructure and respiratory control in mitochondria of rat heart hypertrophied by exercise. *Exp Mol Pathol* **8**, 49–65 (1968).

80. Izumi, C. *et al.* Effect of Left Ventricular Reverse Remodeling on Long-term Outcomes After Aortic Valve Replacement. *Am J Cardiol* **124**, 105–112 (2019).
81. Agarwal, D., Dange, R. B., Vila, J., Otamendi, A. J. & Francis, J. Detraining Differentially Preserved Beneficial Effects of Exercise on Hypertension: Effects on Blood Pressure, Cardiac Function, Brain Inflammatory Cytokines and Oxidative Stress. *PLoS One* **7**, e52569 (2012).
82. Roberts, C. K., Vaziri, N. D. & Barnard, R. J. Effect of Diet and Exercise Intervention on Blood Pressure, Insulin, Oxidative Stress, and Nitric Oxide Availability. *Circulation* **106**, 2530–2532 (2002).
83. Reyes, D. R. A. *et al.* Exercise during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure in aortic stenosis rats. *J Cell Mol Med* **23**, 1235–1245 (2019).
84. Daubert, M. A. & Douglas, P. S. Primary Prevention of Heart Failure in Women. *JACC Heart Fail* **7**, 181–191 (2019).
85. Yeves, A. M., Burgos, J. I., Medina, A. J., Villa-Abrille, M. C. & Ennis, I. L. Cardioprotective role of IGF-1 in the hypertrophied myocardium of the spontaneously hypertensive rats: A key effect on NHE-1 activity. *Acta Physiol (Oxf)* **224**, (2018).
86. De Champlain, J. *et al.* Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens* **26**, 593–601 (2004).
87. Teles, M. C., Oliveira Portes, A. M., Campos Coelho, B. I., Resende, L. T. & Isoldi, M. C. Cardiac changes in spontaneously hypertensive rats: Modulation by aerobic exercise. *Prog Biophys Mol Biol* **177**, 109–124 (2023).
88. Álvarez, M. C. *et al.* Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? *Hypertens Res* **31**, 1465–1476 (2008).

89. Gillis, E. E. *et al.* Oxidative stress induces BH4 deficiency in male, but not female, SHR. *Biosci Rep* **38**, (2018).
90. Reckelhoff, J. F., Romero, D. G. & Yanes Cardozo, L. L. Sex, Oxidative Stress, and Hypertension: Insights From Animal Models. *Physiology (Bethesda)* **34**, 178–188 (2019).
91. Elmarakby, A. A. & Sullivan, J. C. Sex differences in hypertension: Lessons from spontaneously hypertensive rats (SHR). *Clin Sci* **135**, 1791–1804 (2021).
92. Gibb, A. A. & Hill, B. G. Metabolic Coordination of Physiological and Pathological Cardiac Remodeling. *Circ Res* **123**, 107–128 (2018).
93. Doenst, T., Nguyen, T. D. & Abel, E. D. Cardiac metabolism in heart failure: Implications beyond atp production. *Circ Res* **113**, 709–724 (2013).
94. Dávila-Román, V. G. *et al.* Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **40**, 271–277 (2002).
95. Rich, P. R. & Maréchal, A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem* **47**, 1–23 (2010).
96. Mitchell, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 1961 191:4784 **191**, 144–148 (1961).
97. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B. & Gelbard, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* **50**, 98–115 (2011).
98. NICHOLLS, D. G. The Influence of Respiration and ATP Hydrolysis on the Proton-Electrochemical Gradient across the Inner Membrane of Rat-Liver Mitochondria as Determined by Ion Distribution. *Eur J Biochem* **50**, 305–315 (1974).
99. NICHOLLS, D. G. Hamster Brown-Adipose-Tissue Mitochondria: The Control of

- Respiration and the Proton Electrochemical Potential Gradient by Possible Physiological Effectors of the Proton Conductance of the Inner Membrane. *Eur J Biochem* **49**, 573–583 (1974).
100. Yan, C., Duanmu, X., Zeng, L., Liu, B. & Song, Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells* **2019**, Vol. 8, Page 379 **8**, 379 (2019).
101. Archer, S. L. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med* **369**, 2236–2251 (2013).
102. Quintana-Cabrera, R. & Scorrano, L. Determinants and outcomes of mitochondrial dynamics. *Mol Cell* **83**, 857–876 (2023).
103. Yapa, N. M. B., Lisnyak, V., Reljic, B., Ryan, M. T. & Ryan, M. T. Mitochondrial dynamics in health and disease. doi:10.1002/1873-3468.14077.
104. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. & Prudent, J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem* **62**, 341–360 (2018).
105. Mattie, S., Riemer, J., Wideman, J. G. & McBride, H. M. A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space. *Journal of Cell Biology* **217**, 507–515 (2018).
106. Anand, R. *et al.* The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *Journal of Cell Biology* **204**, 919–929 (2014).
107. Patergnani, S. *et al.* The ‘mitochondrial stress responses’: the ‘Dr. Jekyll and Mr. Hyde’ of neuronal disorders. *Neural Regen Res* **17**, 2563–2575 (2022).
108. Ji, W. K., Hatch, A. L., Merrill, R. A., Strack, S. & Higgs, H. N. Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin

- GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *Elife* **4**, (2015).
109. Mahecic, D. *et al.* Mitochondrial membrane tension governs fission. *Cell Rep* **35**, (2021).
 110. Tokuyama, T. & Yanagi, S. Role of Mitochondrial Dynamics in Heart Diseases. *Genes* **2023**, Vol. 14, Page 1876 **14**, 1876 (2023).
 111. Jahani-Asl, A. & Slack, R. S. The phosphorylation state of Drp1 determines cell fate. *EMBO Rep* **8**, 912–913 (2007).
 112. Chang, C. R. & Blackstone, C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci* **1201**, 34–39 (2010).
 113. Lai, Y. S. *et al.* Optogenetically engineered Ca²⁺ oscillation-mediated DRP1 activation promotes mitochondrial fission and cell death. *J Cell Sci* **136**, (2023).
 114. Chan, C. M., Sekar, P., Huang, D. Y., Hsu, S. H. & Lin, W. W. Different Effects of Metformin and A769662 on Sodium Iodate-Induced Cytotoxicity in Retinal Pigment Epithelial Cells: Distinct Actions on Mitochondrial Fission and Respiration. *Antioxidants (Basel)* **9**, 1–15 (2020).
 115. Roe, A. J. & Qi, X. Drp1 phosphorylation by MAPK1 causes mitochondrial dysfunction in cell culture model of Huntington's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **496**, 706 (2018).
 116. Song, S. B., Park, J. S., Jang, S. Y. & Hwang, E. S. Nicotinamide Treatment Facilitates Mitochondrial Fission through Drp1 Activation Mediated by SIRT1-Induced Changes in Cellular Levels of cAMP and Ca²⁺. *Cells* **10**, 1–16 (2021).
 117. Chou, C. H. *et al.* GSK3 β -Mediated Drp1 Phosphorylation Induced Elongated Mitochondrial Morphology against Oxidative Stress. *PLoS One* **7**, (2012).
 118. Gawlowski, T. *et al.* Modulation of dynamin-related protein 1

- (DRP1) function by increased O-linked- β -N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 30024–30034 (2012).
119. Liu, L., Li, Y., Chen, G. & Chen, Q. Crosstalk between mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain mitochondrial homeostasis. *J Biomed Sci* **30**, (2023).
 120. Popov, L. D. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med* **24**, 4892–4899 (2020).
 121. O'Hagan, K. A. *et al.* PGC-1 α is coupled to HIF-1 α -dependent gene expression by increasing mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2188–2193 (2009).
 122. Rowe, G. C., Jiang, A. & Arany, Z. PGC-1 Coactivators in Cardiac Development and Disease. *Circ Res* **107**, 825–838 (2010).
 123. Di, W. *et al.* PGC-1: The Energetic Regulator in Cardiac Metabolism. *Curr Issues Mol Biol* **28**, 29–46 (2018).
 124. Taegtmeyer, H., Sen, S. & Vela, D. Return to the fetal gene program: A suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci* **1188**, 191 (2010).
 125. Persad, K. L. & Lopaschuk, G. D. Energy Metabolism on Mitochondrial Maturation and Its Effects on Cardiomyocyte Cell Fate. *Front Cell Dev Biol* **10**, 886393 (2022).
 126. Sun, L. *et al.* Acetylcholine promotes ROS detoxification against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through FoxO3a/PGC-1 α dependent superoxide dismutase. *Cell Physiol Biochem* **34**, 1614–1625 (2014).
 127. Killackey, S. A., Philpott, D. J. & Girardin, S. E. Mitophagy pathways in health and disease. (2020) doi:10.1083/jcb.202004029.
 128. Sekine, S. & Youle, R. J. PINK1 import regulation; a fine system

- to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC Biol* **16**, (2018).
129. Ding, W. X. & Yin, X. M. Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* **393**, 547–564 (2012).
 130. Titus, A. S., Sung, E. A., Zablocki, D. & Sadoshima, J. Mitophagy for cardioprotection. *Basic Research in Cardiology* **2023 118:1** **118**, 1–24 (2023).
 131. Vendelin, M. *et al.* Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: A ‘crystal-like’ pattern. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, 757–767 (2005).
 132. Picard, M., White, K. & Turnbull, D. M. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J Appl Physiol (1985)* **114**, 161–171 (2013).
 133. Cao, Y. *et al.* Miro2 regulates inter-mitochondrial communication in the heart and protects against TAC-Induced cardiac dysfunction. *Circ Res* **125**, 728–743 (2019).
 134. Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **47**, 333–343 (2009).
 135. Nolfi-Donagan, D., Braganza, A. & Shiva, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol* **37**, (2020).
 136. Mazat, J. P., Devin, A. & Ransac, S. Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cellular and Molecular Life Sciences* **77**, 455–465 (2020).
 137. CROMPTON, M. & HEID, I. The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur J Biochem* **91**, 599–608 (1978).
 138. Haumann, J. *et al.* Slow Ca²⁺ Efflux by Ca²⁺/H⁺ Exchange in Cardiac Mitochondria Is

- Modulated by Ca²⁺ Re-uptake via MCU, Extra-Mitochondrial pH, and H⁺ Pumping by FOF1-ATPase. *Front Physiol* **10**, 414309 (2019).
139. Bernardi, P. *et al.* Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death & Differentiation* **2023 30:8 30**, 1869–1885 (2023).
140. Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J. & Molkentin, J. D. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* **9**, 550–555 (2007).
141. Kwong, J. Q. *et al.* Genetic deletion of the mitochondrial phosphate carrier desensitizes the mitochondrial permeability transition pore and causes cardiomyopathy. *Cell Death Differ* **21**, 1209–1217 (2014).
142. Wang, Y. H., Tao, A. Y., Vaeth, M. & Feske, S. CALCIUM REGULATION OF T CELL METABOLISM. *Curr Opin Physiol* **17**, 207–223 (2020).
143. Porter, G. A. & Beutner, G. Cyclophilin D, Somehow a Master Regulator of Mitochondrial Function. *Biomolecules* **2018, Vol. 8, Page 176 8**, 176 (2018).
144. Rottenberg, H. & Hoek, J. B. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore. *Aging Cell* **16**, 943–955 (2017).
145. Rodrigues, F. P. *et al.* Characterization of the stimulus for reactive oxygen species generation in calcium-overloaded mitochondria. *Redox Report* **16**, 108–113 (2011).
146. Mårtensson, C. U., Doan, K. N. & Becker, T. Effects of lipids on mitochondrial functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**, 102–113 (2017).

147. Horvath, S. E. & Daum, G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* **52**, 590–614 (2013).
148. Van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008** 9:2 **9**, 112–124 (2008).
149. Van Den Brink-Van Der Laan, E., Antoinette Killian, J. & De Kruijff, B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1666**, 275–288 (2004).
150. Schägger, H. & Pfeiffer, K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO Journal* **19**, 1777–1783 (2000).
151. Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M. & Petrosillo, G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1837**, 408–417 (2014).
152. Zhang, M., Mileykovskaya, E. & Dowhan, W. Gluing the Respiratory Chain Together: CARDIOLIPIN IS REQUIRED FOR SUPERCOMPLEX FORMATION IN THE INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43553–43556 (2002).
153. McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D. R. & Ryan, M. T. Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Are Destabilized in Barth Syndrome Patients. *J Mol Biol* **361**, 462–469 (2006).
154. Hoffmann, B., Stöckl, A., Schlame, M., Beyer, K. & Klingenberg, M. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1940–1944 (1994).
155. Stepanyants, N. *et al.* Cardiolipin's propensity for

- phase transition and its reorganization by dynamin-related protein 1 form a basis for mitochondrial membrane fission. *Mol Biol Cell* **26**, 3104–3116 (2015).
156. Choi, S. Y. *et al.* A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nature Cell Biology* **2006 8:11 8**, 1255–1262 (2006).
157. Friedman, J. R., Mourier, A., Yamada, J., Michael McCaffery, J. & Nunnari, J. MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *Elife* **2015**, 1–61 (2015).
158. Rabl, R. *et al.* Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. *Journal of Cell Biology* **185**, 1047–1063 (2009).
159. Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R. & Kühlbrandt, W. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* **27**, 1154–1160 (2008).
160. Pennington, E. R. *et al.* Distinct membrane properties are differentially influenced by cardiolipin content and acyl chain composition in biomimetic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1859**, 257–267 (2017).
161. Miranda, É. G. A. *et al.* Cardiolipin Structure and Oxidation Are Affected by Ca²⁺ at the Interface of Lipid Bilayers. *Front Chem* **7**, 464472 (2020).
162. Wilkinson, J. A., Silvera, S. & LeBlanc, P. J. The effect of cardiolipin side chain composition on cytochrome c protein conformation and peroxidase activity. *Physiol Rep* **9**, e14772 (2021).
163. Scheinowitz, M. *et al.* Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression. *Growth Hormone*

- and IGF Research* **13**, 19–25 (2003).
164. De Palo, E. F., Gatti, R., Lancerin, F., Cappellin, E. & Spinella, P. Correlations of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I): Effects of exercise and abuse by athletes. *Clinica Chimica Acta* **305**, 1–17 (2001).
165. Neri Serneri, G. G. *et al.* Increased Cardiac Sympathetic Activity and Insulin-Like Growth Factor-I Formation Are Associated With Physiological Hypertrophy in Athletes. *Circ Res* **89**, 977–982 (2001).
166. Catalucci, D., Latronico, M. V. G., Ellingsen, O. & Condorelli, G. Physiological myocardial hypertrophy: how and why? *Front Biosci* **13**, 312–324 (2008).
167. Kim, J. *et al.* Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol* **22**, 2532–2543 (2008).
168. Gerche, A. & McMullen, J. R. Let's keep running... exercise, basic science and the knowledge gaps. *Heart* **101**, 742–743 (2015).
169. Von Lewinski, D., Voß, K., Hülsmann, S., Kögler, H. & Pieske, B. Insulin-like growth factor-1 exerts Ca²⁺-dependent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circ Res* **92**, 169–176 (2003).
170. Cittadini, A. *et al.* Insulin-like growth factor-1 but not growth hormone augments mammalian myocardial contractility by sensitizing the myofilament to Ca²⁺ through a wortmannin-sensitive pathway: studies in rat and ferret isolated muscles. *Circ Res* **83**, 50–59 (1998).
171. Vetter, U., Kupferschmid, C., Lang, D. & Pentz, S. Insulin-like growth factors and insulin increase the contractility of neonatal rat cardiocytes in vitro. *Basic Res Cardiol* **83**, 647–654 (1988).
172. Campos, J. C., Gomes, K. M. S. & Ferreira, J. C. B. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular

- diseases. *Food Chem Toxicol* **62**, 107–119 (2013).
173. Weeks, K. L. *et al.* Phosphoinositide 3-Kinase p110 α Is a Master Regulator of Exercise-Induced Cardioprotection and PI3K Gene Therapy Rescues Cardiac Dysfunction. *Circ Heart Fail* **5**, 523–534 (2012).
174. Wisløff, U., Loennechen, J. P., Currie, S., Smith, G. L. & Ellingsen, Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **54**, 162–174 (2002).
175. Welch, S. *et al.* Cardiac-Specific IGF-1 Expression Attenuates Dilated Cardiomyopathy in Tropomodulin-Overexpressing Transgenic Mice. *Circ Res* **90**, 641–648 (2002).
176. Touvron, M. *et al.* Locally expressed IGF1 propeptide improves mouse heart function in induced dilated cardiomyopathy by blocking myocardial fibrosis and SRF-dependent CTGF induction. *DMM Disease Models and Mechanisms* **5**, 481–491 (2012).
177. McMullen, J. R. *et al.* Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110 α) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 612–617 (2007).
178. Kajstura, J. *et al.* IGF-1 Overexpression Inhibits the Development of Diabetic Cardiomyopathy and Angiotensin II-Mediated Oxidative Stress. *Diabetes* **50**, 1414–1424 (2001).
179. Vaessen, N. *et al.* A Polymorphism in the Gene for IGF-1 Functional Properties and Risk for Type 2 Diabetes and Myocardial Infarction. *Diabetes* **50**, 637–642 (2001).
180. Bleumink, G. S. *et al.* A promoter polymorphism of the insulin-like growth factor-I gene is associated with left ventricular

- hypertrophy. *Heart* **91**, 239–240 (2005).
181. O'Carroll, A. M., Selby, T. L., Palkovits, M. & Lolait, S. J. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1492**, 72–80 (2000).
182. Lee, D. L. *et al.* Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* **74**, 34–41 (2000).
183. Hosoya, M. *et al.* Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* **275**, 21061–21067 (2000).
184. Tatemoto, K. *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 471–476 (1998).
185. Dalzell, J. R. *et al.* The Emerging Potential of the Apelin-APJ System in Heart Failure. *J Card Fail* **21**, 489–498 (2015).
186. Ronkainen, V. *et al.* Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J* **21**, 1821–1830 (2007).
187. Medhurst, A. D. *et al.* Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* **84**, 1162–1172 (2003).
188. O'Dowd, B. F. *et al.* A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* **136**, 355–360 (1993).
189. Perjés, Á. *et al.* Apelin increases cardiac contractility via protein kinase C ϵ - and extracellular signal-regulated kinase-dependent mechanisms. *PLoS One* **9**, (2014).

190. Szokodi, I. *et al.* Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* **91**, 434–440 (2002).
191. Lee, D. K. *et al.* Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* **146**, 231–236 (2005).
192. Foussal, C. *et al.* Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* **584**, 2363–2370 (2010).
193. Xie, F. *et al.* Apelin-13 promotes cardiomyocyte hypertrophy via PI3K-Akt-ERK1/2-p70S6K and PI3K-induced autophagy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **47**, 969–980 (2015).
194. Smith, C. C. T. & Yellon, D. M. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection. *Pharmacol Ther* **129**, 206–219 (2011).
195. Zhong, J. C. *et al.* Effects of all-trans retinoic acid on orphan receptor APJ signaling in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **65**, 743–750 (2005).
196. Zhang, J. *et al.* Exercise training promotes expression of apelin and APJ of cardiovascular tissues in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* **79**, 1153–1159 (2006).
197. Medeiros, A. *et al.* *Efeito Do Treinamento Físico de Natação Sobre o Sistema Cardiovascular de Ratos Normotensos*. vol. 574 (2000).
198. Buñag, R. D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. <https://doi.org/10.1152/jappl.1973.34.2.279> **34**, 279–282 (1973).
199. Fritz, M. & Rinaldi, G. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: Influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. *J Pharmacol Toxicol Methods* **58**, 215–221 (2008).
200. Lang, R. M. *et al.* Recommendations for Chamber

- Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology. *Journal of the American Society of Echocardiography* **18**, 1440–1463 (2005).
201. Boon, J. Veterinary Echocardiography . Evaluation of size, function, and hemodynamics str. 105-196. *Veterinary echocardiography. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011 Second Edi*, 632 (2011).
202. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **2012 9:7 9**, 676–682 (2012).
203. Caffrey, B. J. *et al.* Semi-automated 3D segmentation of human skeletal muscle using Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopic images. *J Struct Biol* **207**, 1–11 (2019).
204. Brocher, J. biovoxxel/BioVoxxel-Toolbox: BioVoxxel Toolbox. (2022)
doi:10.5281/ZENODO.5986130.
205. Kam, K. M., Zeng, L., Zhou, Q., Tran, R. & Yang, J. On assessing spatial uniformity of particle distributions in quality control of manufacturing processes. *J Manuf Syst* **32**, 154–166 (2013).
206. Ibañez, M. A. *et al.* Chronic GPER activation prevents ischemia/reperfusion injury in ovariectomized rats. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1866**, (2022).
207. Korde, A. S. & Maragos, W. F. A modified, rapid fluorometric method for the quantification of mitochondrial calcium. *Ann Neurosci* **16**, 49–53 (2009).
208. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509 (1957).

209. Das, S. *et al.* ATP Citrate Lyase Improves Mitochondrial Function in Skeletal Muscle. *Cell Metab* **21**, 868–876 (2015).
210. Kruger, N. J. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* **32**, 9–15 (1994).
211. Martinez, V. R. *et al.* Effect of the structural modification of Candesartan with Zinc on hypertension and left ventricular hypertrophy. *Eur J Pharmacol* **946**, 175654 (2023).
212. Rodrigues, N. A. *et al.* Load-matched acute and chronic exercise induce changes in mitochondrial biogenesis and metabolic markers. *Appl Physiol Nutr Metab* **46**, 1196–1206 (2021).
213. Park, S. Y. *et al.* Exercise training improves vascular mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **310**, H821–H829 (2016).
214. Vigelsø, A., Andersen, N. B. & Dela, F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **6**, 84 (2014).
215. Boudina, S. *et al.* Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* **112**, 2686–2695 (2005).
216. Eigentler A. Oroboros Instruments High-Resolution Respirometry Oroboros Protocols Enzymes Laboratory Protocol: Citrate synthase a mitochondrial marker enzyme. *Mitochondrial Physiology Network* **17**, 1–12 (2020).
217. Adresi, Y. *et al.* The Effects of High-Fat Diets on The Oxidative Stress in Adipose Tissue in Rats, Whose Retroperitoneal Adipose Tissues are Denervated Retroperitoneal Yağ Dokusu Denerve Edilmiş Sıçanlarda Yüksek Yağlı Diyetin Yağ Dokusundaki Oksidatif Strese Etkisi. doi:10.22312/sdusbed.407365.

218. Aebi, H. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis* 673–684 (1974) doi:10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3.
219. Harvey, S., Phillips, J. G., Rees, A. & Hall, T. R. Stress and adrenal function. *Journal of Experimental Zoology* **232**, 633–645 (1984).
220. Sumi, K. *et al.* Citrate Synthase Insufficiency Leads to Specific Metabolic Adaptations in the Heart and Skeletal Muscles Upon Low-Carbohydrate Diet Feeding in Mice. *Front Nutr* **9**, (2022).
221. Glancy, B. & Balaban, R. S. Protein composition and function of red and white skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, 1280–1290 (2011).
222. Wilson, J. M. *et al.* The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. *J Strength Cond Res* **26**, 1724–1729 (2012).
223. Tarnopolsky, M. A. *et al.* Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, (2007).
224. Burgomaster, K. A. *et al.* Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *Journal of Physiology* **586**, 151–160 (2008).
225. Holloszy, J. O. & Coyle, E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **56**, 831–838 (1984).
226. Fritzen, A. M. *et al.* Effect of Aerobic Exercise Training and Deconditioning on Oxidative Capacity and Muscle Mitochondrial Enzyme Machinery in Young and Elderly Individuals. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, Vol. 9, Page 3113 **9**, 3113 (2020).
227. Hoshino, D., Kitaoka, Y. & Hatta, H. High-intensity interval training enhances oxidative capacity and

- substrate availability in skeletal muscle. *J Phys Fit Sports Med* **5**, 13–23 (2016).
228. Vepsäläinen, T. *et al.* Prolonged P wave duration predicts stroke mortality among type 2 diabetic patients with prevalent non-major macrovascular disease. *BMC Cardiovasc Disord* **14**, (2014).
229. Maheshwari, A. *et al.* Relation of Prolonged P-wave Duration to Risk of Sudden Cardiac Death in the General Population (From the Atherosclerosis Risk in Communities Study). *Am J Cardiol* **119**, 1302 (2017).
230. Redfearn, D. P., Lane, J., Ward, K. & Stafford, P. J. High-resolution analysis of the surface P wave as a measure of atrial electrophysiological substrate. *Ann Noninvasive Electrocardiol* **11**, 12–19 (2006).
231. Ariyarajah, V., Mercado, K., Apiyasawat, S., Puri, P. & Spodick, D. H. Correlation of left atrial size with p-wave duration in interatrial block. *Chest* **128**, 2615–2618 (2005).
232. Goyal, S. B. & Spodick, D. H. Electromechanical dysfunction of the left atrium associated with interatrial block. *Am Heart J* **142**, 823–827 (2001).
233. Cañón-Montañez, W., Santos, Á. B. S. & Foppa, M. Strain longitudinal global: un parámetro útil para evaluar disfunción ventricular izquierda subclínica en el síndrome metabólico. *Revista Colombiana de Cardiología* **23**, 112–119 (2016).
234. Berry, B. J., Trewin, A. J., Amitrano, A. M., Kim, M. & Wojtovich, A. P. Use the Protonmotive Force: Mitochondrial Uncoupling and Reactive Oxygen Species. *J Mol Biol* **430**, 3873–3891 (2018).
235. Wilkinson, J. A., Silvera, S. & LeBlanc, P. J. The effect of cardiolipin side chain composition on cytochrome c protein conformation and peroxidase activity. *Physiol Rep* **9**, e14772 (2021).

236. Chen, C. Y., Hsu, H. C. & Chen, M. F. The reduced autophagic response by oxidative stress in angiotensin II-induced hypertrophic H9C2 cells causes more apoptotic cell death. *Exp Biol Med* **239**, 1688–1698 (2014).
237. Patel, H. *et al.* Aerobic vs anaerobic exercise training effects on the cardiovascular system. *World J Cardiol* **9**, 134–138 (2017).
238. Scheinowitz, M. *et al.* Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression. *Growth Horm IGF Res* **13**, 19–25 (2003).
239. Seppet, E. K. *et al.* Intracellular energetic units in healthy and diseased hearts. *Exp Clin Cardiol* **10**, (2005).
240. Nagel, A. K. & Ball, L. E. O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity. *Amino Acids* **46**, 2305 (2014).
241. Very, N., Vercoutter-Edouart, A. S., Lefebvre, T., Hardivillé, S. & El Yazidi-Belkoura, I. Cross-dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR axis in human chronic diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 415008 (2018).
242. Luo, B., Soesanto, Y. & McClain, D. A. Protein Modification by O-Linked GlcNAc Reduces Angiogenesis by Inhibiting Akt Activity in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 651–657 (2008).
243. HUNG, C. H. I. S. H. E. N. G. *et al.* Aldosterone suppresses cardiac mitochondria. *Translational Research* **239**, 58–70 (2022).
244. Tanaka, T. *et al.* Mitochondrial dynamics in exercise physiology. *Pflugers Arch* **472**, 137–153 (2020).
245. Gu, C., Yan, J., Zhao, L., Wu, G. & Wang, Y. L. Regulation of Mitochondrial Dynamics by Aerobic Exercise in Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med* **8**, (2022).

246. Memme, J. M., Erlich, A. T., Phukan, G. & Hood, D. A. Exercise and mitochondrial health. *J Physiol* **599**, 803–817 (2021).
247. Alizadeh Pahlavani, H., Laher, I., Knechtle, B. & Zouhal, H. Exercise and mitochondrial mechanisms in patients with sarcopenia. *Front Physiol* **13**, (2022).
248. Santel, A. & Frank, S. Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* **60**, 448–455 (2008).
249. Guan, Y., Drake, J. C. & Yan, Z. Exercise-Induced Mitophagy in Skeletal Muscle and Heart. *Exerc Sport Sci Rev* **47**, 151–156 (2019).
250. Chen, L. *et al.* PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Quality Control: Molecular Mechanisms and Implications for Heart Failure. *Front Cell Dev Biol* **10**, 871357 (2022).
251. Thirupathi, A. & de Souza, C. T. Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise. *J Physiol Biochem* **73**, 487–494 (2017).
252. Schwartz, B., Gjini, P., Gopal, D. M. & Fetterman, J. L. Inefficient Batteries in Heart Failure: Metabolic Bottlenecks Disrupting the Mitochondrial Ecosystem. *JACC Basic Transl Sci* **7**, 1161–1179 (2022).
253. Patten, I. S. & Arany, Z. PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. *Trends Endocrinol Metab* **23**, 90–97 (2012).
254. Scarpulla, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1269–1278 (2011).
255. Rubin, D. A. *et al.* Endocrine response to acute resistance exercise in obese versus lean physically active men. *Eur J Appl Physiol* **115**, 1359–1366 (2015).

256. Zhang, X. *et al.* Exercise Improves Heart Function after Myocardial Infarction: The Merits of AMPK. *Cardiovasc Drugs Ther* 1–9 (2024) doi:10.1007/S10557-024-07564-2/FIGURES/1.
257. Karmazyn, M., Kilic, A. & Javadov, S. The role of NHE-1 in myocardial hypertrophy and remodelling. *J Mol Cell Cardiol* **44**, 647–653 (2008).
258. Yang, K. *et al.* The Key Roles of GSK-3 β in Regulating Mitochondrial Activity. *Cell Physiol Biochem* **44**, 1445–1459 (2017).
259. Rasola, A. *et al.* Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 726–731 (2010).
260. Juhaszova, M. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 1535 (2004).
261. Theeuwes, W. F., Gosker, H. R., Schols, A. M. W. J., Langen, R. C. J. & Remels, A. H. V. Regulation of PGC-1 α expression by a GSK-3 β -TFEB signaling axis in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1867**, (2020).
262. Theeuwes, W. F. *et al.* Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) enhances skeletal muscle oxidative metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1863**, 3075–3086 (2017).
263. Troncoso, R., Ibarra, C., Vicencio, J. M., Jaimovich, E. & Lavandero, S. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab* **25**, 128–137 (2014).
264. Li, Y. *et al.* Insulin-like growth factor-1 receptor activation inhibits oxidized LDL-induced cytochrome C release and apoptosis via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *Arterioscler*

- Thromb Vasc Biol* **23**, 2178–2184 (2003).
265. Wan, L. *et al.* Transmembrane peptide 4 and 5 of APJ are essential for its heterodimerization with OX1R. *Biochem Biophys Res Commun* **521**, 408–413 (2020).
266. Li, Y. *et al.* Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal* **24**, 991–1001 (2012).
267. Kim, J. G. *et al.* Heterodimerization of glycosylated insulin-like growth factor-1 receptors and insulin receptors in cancer cells sensitive to anti-IGF1R antibody. *PLoS One* **7**, (2012).
268. Crudden, C. *et al.* Blurring Boundaries: Receptor Tyrosine Kinases as functional G Protein-Coupled Receptors. *Int Rev Cell Mol Biol* **339**, 1–40 (2018).
269. Grisanti, L. A., Guo, S. & Tilley, D. G. Cardiac GPCR-Mediated EGFR Transactivation: Impact and Therapeutic Implications. *J Cardiovasc Pharmacol* **70**, 3–9 (2017).
270. Gavi, S., Shumay, E., Wang, H. Y. & Malbon, C. C. G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol Metab* **17**, 48–54 (2006).

7. Anexos

7.1 Anexo A: macro de preprocesamiento de imágenes para MET

```
//Este macro automatiza el preprocesamiento de imágenes de MET
```

```
//dentro de una carpeta especificada por el usuario y devuelve
```

```
//las imágenes procesadas en otra carpeta también especificada
```

```
//por el usuario.
```

```
function preprocessing(input,list,output) {
```

```
open(input+list);
```

```
selectWindow(list);
```

```
run("Median...", "radius=1");
```

```
run("Bin...", "x=2 y=2 bin=Median");
```

```
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.3 normalize equalize");
```

```
outname = File.getName(list);
```

```
saveAs("Tiff", output + "/" + outname);
```

```
close(list);
```

```
}
```

```
showMessage("Seleccione carpeta de input...");
```

```
input = getDirectory("");
```

```
showMessage("Seleccione carpeta de output...");
```

```
output = getDirectory("");
```

```

list = getFileList(input);

for (i = 0; i < list.length; i++){

preprocessing(input, list[i], output);

}

```

7.2 Anexo B: macro para determinación de GSE

//Este macro automatiza la evaluación de GSE a partir de imágenes binarizadas
//utilizando el centroide de las mitocondrias y modificando la cantidad de
//cuadrantes desde 1 hasta 100, devolviendo el valor de partículas por
cuadrante.

```

print("\\Clear");

open();

run("Find Maxima...", "prominence=10 output=[Single Points]");

w = getWidth();

h = getHeight();

for (n=1; n<11; n = n + 1){

    //define el tamaño de los cuadrantes x/n, y/n,

//donde n = num de cuadrantes deseados

    XroiSize = w/n;

    YroiSize = h/n;

```

```

position = newArray(XroiSize, YroiSize, 2*XroiSize, 2*YroiSize);

//dibuja la grilla de n cuadrantes y los agrega al ROImanager

for (x = 0; x < w-1; x = x + XroiSize) {

    for (y = 0; y < h-1; y = y + YroiSize) {

        makeRectangle(x, y, XroiSize, YroiSize);

        roiManager("add");

    }

}

print("Conteo con ", n*n , " cuadrantes.");

//cuenta en cada cuadrante la cantidad de puntos

z = roiManager("count");

for (i = 1; i < z+1; i = i+1) {

    roiManager("select", i-1);

    run("Clear Results");

    run("Analyze Particles...", "display clear");

    q = getValue("results.count");

    print(i , q);

}

roiManager("delete");

}

```

```
run("Clear Results");
```

```
close("Results");
```