



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**Facultad de Medicina**

**Licenciatura en Biomedicina**

**Instituto de Fisiología**

**Laboratorio de Fisiología Cardiovascular**

**“Remodelación del sistema de inervación intrínseco cardiaco en la hipertrofia e insuficiencia cardiaca ventricular derecha”**

**Tesis para obtener del grado de:  
Licenciado en Biomedicina**

**Presenta:  
Ernesto Cortes Gallardo**

**Director de Tesis:  
Dra. María de Jesús Gómez Villalobos**

**Puebla, octubre, 2020.**





**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**

**Facultad de Medicina  
Licenciatura en Biomedicina**

**Instituto de Fisiología  
Laboratorio de Fisiología Cardiovascular**

**“Remodelación del sistema de inervación intrínseco  
cardíaco en la hipertrofia e insuficiencia cardíaca  
ventricular derecha”**

**Tesis para obtener del grado de:  
Licenciado en Biomedicina**

**Presenta:  
Ernesto Cortes Gallardo**

**Director de Tesis:  
Dra. María de Jesús Gómez Villalobos**

**Puebla, octubre, 2020.**



INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA DE LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA

LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA CARDIOVASCULAR

## COORDINACIÓN DE LA LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

## COORDINACIÓN DE TITULACIÓN Y EFICIENCIA TERMINAL

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Ma. De Jesús Gómez Villalobos** por permitirme participar en este proyecto, por su valioso aporte académico en mi formación y por brindarme el gusto por la investigación cardiovascular

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** y al **Instituto de Fisiología**, de los que estoy orgulloso de ser egresado.

A **todos mis profesores**, por sus contribuciones en mi formación profesional y por enseñarme todo lo que aprendí lo cual será trascendental en mi desarrollo académico.

A **todos mis compañeros del laboratorio de fisiología cardiovascular**, por su apoyo y disposición para ayudarme siempre que lo necesite.

**Dedicada**

**A mi abuela Elodia Pérez Romero**

**y a mis padres, con cariño y admiración,**

**porque lo que soy y he logrado, ha sido gracias a su apoyo.**

## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	14
Abstract .....	15
<b>2. Introducción</b> .....	16
<b>3. Antecedentes</b> .....	17
<b>3.1 Antecedentes generales</b> .....	17
3.1.1 Morfología y fisiología del ventrículo derecho .....	17
3.1.2 Inervación extrínseca cardiaca .....	18
3.1.3 Sistema de inervación intrínseco cardiaco .....	20
3.1.4 Inervación intrínseca del ventrículo derecho.....	22
3.1.5 Fenotipo neuroquímico .....	23
<b>3.1.6 Alteraciones de la inervación intrínseca en los procesos fisiopatológicos</b> .....	25
3.1.7 Insuficiencia cardiaca derecha.....	25
3.1.8 Remodelación ventricular .....	26
3.1.9 Remodelación nerviosa funcional en la hipertrofia e ICD .....	28
3.1.10 Remodelación nerviosa estructural en la hipertrofia e ICD .....	29
3.1.11 Alteraciones en los miocardiocitos.....	29
<b>3.1.12 De la hipertrofia ventricular compensatoria a la insuficiencia cardiaca</b> .....	31
3.1.12 Activación autonómica simpática .....	31
3.1.13 Activación del eje renina-angiotensina-aldosterona.....	33
3.1.14 Activación de la respuesta inflamatoria .....	35
<b>3.2 Antecedentes específicos</b> .....	36
3.2.1 Monocrotalina: historia, naturaleza y toxicidad .....	36
3.2.2 El modelo de hipertrofia e insuficiencia cardiaca inducida por monocrotalina .....	38
<b>4. Justificación</b> .....	43
<b>5. Planteamiento del problema</b> .....	44
<b>6. Hipótesis científica</b> .....	45
<b>6.1 Hipótesis estadística</b> .....	45
<b>7. Objetivos</b> .....	46
7.1 Objetivo general .....	46
7.2 Objetivos particulares.....	46
<b>8. Materiales y métodos</b> .....	48
8.1 Modelo in vivo: .....	48

8.2 Técnicas y procedimientos .....	49
8.2.1 Registro electrocardiográfico .....	49
8.2.2 Administración del fármaco .....	49
8.2.3 Sacrificio de los modelos de experimentación .....	50
8.2.4 Histología .....	50
8.2.4 Tinción de Golgi-Cox.....	50
8.2.5 Técnica de acetilcolinesterasa en corazón por el método de Karnovsky .....	51
8.2.6 Técnica de ácido glioxílico por el método de la Torre .....	51
8.2.7 Cuantificación de marcadores de inervación por métodos colorimétricos.....	52
8.2.7 Cuantificación de acetilcolinesterasa por el método de Ellman .....	52
8.2.8 Determinación de nitritos por la reacción de Griess .....	53
8.2.9 Estudio hemodinámico.....	54
8.2.9 Presión intraventricular derecha.....	54
<b>8.3 Análisis estadístico.....</b>	<b>56</b>
<b>8.4 Diagrama de trabajo .....</b>	<b>57</b>
8.5 Bioética .....	58
<b>9. Resultados .....</b>	<b>59</b>
9.1 Registros electrocardiográficos .....	59
9.2 Peso corporal, cardíaco y pulmonar .....	60
9.3 Análisis cualitativo macroscópico.....	63
9.4 Análisis morfométrico de laminillas por el método Golgi-Cox .....	65
9.5 Fotomicrografías por la técnica de Golgi-Cox .....	67
9.6 Análisis cualitativo de fluorescencia por la técnica de ácido glioxílico.....	71
9.7 Tinción de acetilcolinesterasa por el método de Karnovsky .....	75
9.8 Cuantificación de acetilcolinesterasa por el método de Ellman.....	76
9.9 Cuantificación de NO <sub>2</sub> por la reacción de Griess .....	78
9.10 Presión intraventricular derecha.....	80
<b>10. Discusión .....</b>	<b>81</b>
<b>11. Conclusiones .....</b>	<b>88</b>
<b>12. Anexos .....</b>	<b>90</b>
12.1 Técnica de Golgi Cox.....	90
12.2 Tinción de acetilcolinesterasa por el método de Karnovsky .....	91
12.3 Contraintinción hematoxilina/eosina.....	92
12.4 Técnica de ácido Glioxílico por el método de la Torre .....	93
12.5 Cuantificación de AChE por el método de Ellman .....	94

12.6	Determinación de nitritos por la reacción de Griess .....	95
12.7	Clasificación de la insuficiencia cardiaca .....	97
12.8	Neurotransmisores a nivel cardiaco .....	99
12.8.1	Norepinefrina .....	99
12.8.2	Acetilcolina .....	99
<b>13.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>101</b>

## 1.1 Índice de abreviaturas

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChT	Acetiltiocolina
AD	Aurícula derecha
AI	Aurícula izquierda
AMPc	Adenosina mono fosfato cíclico
Ang II	Angiotensina II
ANP	Péptido natriuretico auricular
AP	Arteria pulmonar
AV	Auriculoventricular
AVD	Atrio ventral derecho
AVI	Atrio ventral izquierdo
BNP	Péptido natriuretico cerebral
CARD	Cardiomegalia
CD	Coronario derecho
CGRP	Péptido relacionado con el gen calcitonina
ChAT	Colinacetiltransferasa
CTRL	Grupo control
CTRL + HVD	Control con hipertrofia de ventrículo derecho
DI	Dorsal izquierdo
DM	Dorsal medio
DTNB	Ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
ET-1	Endotelina-1
FC	Frecuencia cardiaca
FCN	Factor de crecimiento nervioso
FE	Fracción de eyección
HAP	Hipertensión arterial pulmonar
HFpEF	Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada

HFrEF	Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección reducida
HP	Hipertensión pulmonar
HVD	Hipertrofia de ventrículo derecho
IC	Insuficiencia cardiaca
ICD	Insuficiencia cardiaca derecha
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IVD	Insuficiencia ventricular derecha
MCT	Monocrotalina
mU	Miliunidades
NCX	Intercambiador sodio/calcio
NE	Norepinefrina
NHE	Intercambiador sodio/hidrogeniones
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
NO <sub>2</sub>	Nitritos
NPY	Neuropéptido Y
NT	Neurotrofinas
ON	Óxido nítrico
PCI	Plexo coronario izquierdo
RAAS	Sistema renina angiotensina aldosterona
RE	Retículo endoplásmico
RVP	Resistencia vascular pulmonar
SIIC	Sistema de inervación intrínseco cardiaco
SNS	Sistema nervioso simpático
SP	Sustancia P
TH	Tirosina hidroxilasa
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VD	Ventrículo derecho
VFC	Variabilidad de la frecuencia cardiaca
VI	Ventrículo izquierdo
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

## 1. Resumen

El sistema de inervación intrínseco cardiaco (SIIC) esta críticamente involucrado en la regulación autonómica de la función cardiaca, sin embargo, en procesos patológicos como la hipertrofia e insuficiencia de ventrículo derecho (IVD), este sistema experimenta un proceso de remodelación adversa que conlleva a efectos deletéreos favoreciendo la generación de arritmias letales que comprometen significativamente la vida de un individuo. El objetivo de este estudio es caracterizar la remodelación del SIIC mediante técnicas histológicas para evaluar la inervación del VD, además de cuantificar marcadores como AchE y NO<sub>2</sub> en diferentes tejidos de modelos experimentales con hipertrofia e IVD. **Metodología:** Se utilizaron 32 ratas Wistar Kyoto macho de dos meses de edad con un peso promedio de 200 g. Se establecieron los siguientes grupos: CTRL (n = 8) (SSI 0.9 % 0.3 ml ip), MCT (n = 8) administradas con monocrotalina (60 mg/kg, ip), CTRL + HVD (n = 8) (SSI 0.9 % 0.3 ml ip) y CARD (n = 8) (HVD + MCT 60 mg/kg, ip). Se analizaron las características macroscópicas cardiacas en cortes de VD y se aplicaron las técnicas histológicas: Golgi-Cox para determinar densidad y tamaño ganglionar, AchE para evaluar inervación parasimpática y ácido glioxílico para evaluar inervación simpática. Adicionalmente se llevó a cabo la cuantificación de AchE y NO<sub>2</sub> en diferentes tejidos de la vía por el método de Ellman, y la reacción de Griess respectivamente. **Resultados:** Se encontró un incremento en el grosor de la pared del VD (mm) en los grupos MCT, CTRL + HVD y CARD con respecto al grupo CTRL (P < 0.0001). En general se encontró una menor densidad ganglionar, menor número de fibras y tamaño ganglionar en los grupos con MCT en comparación con el grupo CTRL, al igual que en la impregnación simpática y parasimpática del análisis cualitativo. En relación con la cuantificación de AchE, se encontraron diferencias en todos los tejidos de los cuatro grupos con una tendencia en decremento desde el grupo CTRL al grupo CARD. La cuantificación de NO<sub>2</sub> mostró la misma tendencia de disminución para ambos ventrículos, pulmón y suero. **Conclusión:** El presente estudio muestra evidencia cuantitativa y cualitativa que refleja la degeneración de la inervación intrínseca de VD en la hipertrofia e IC. Ya que la remodelación del SIIC es diferente conforme avanza el proceso fisiopatológico desde la hipertrofia a la IC, se sugiere que dicha disminución es dependiente del tiempo y se puede ver reflejada incluso en otros tejidos y cámaras cardiacas.

## Abstract

The intrinsic cardiac nervous system (ICNS) is critically involved in autonomic regulation of cardiac function. However, in pathological processes such as hypertrophy and right heart failure (RHF) the ICNS undergoes adverse remodeling which leads to deleterious effects favoring the generation of life-threatening arrhythmias that significantly puts an individual's life at risk. Therefore, the aims of this study were to characterize the remodeling of the ICNS using histological techniques to evaluate RV innervation, in addition to quantifying markers such as AchE and NO<sub>2</sub> in different samples of experimental models with hypertrophy and RHF. **Methods:** 32 two-month-old male Wistar Kyoto rats with an average weight of 200 g were used. The following groups were established and administered either with monocrotaline or saline solution as controls: CTRL (n = 8) (SSI 0.9 % 0.3 ml ip), MCT (n = 8) (60 mg / kg, ip), CTRL + HVD (n = 8) (SSI 0.9 % 0.3 ml ip) and CARD (n = 8) (HVD + MCT 60 mg/kg, ip). The gross anatomy characteristics were analyzed. In RV sections the histological techniques were applied: Golgi-Cox to determine cardiac ganglia density and size, AchE to assess parasympathetic innervation and glyoxylic acid to assess sympathetic innervation. Additionally, the quantification of AchE and NO<sub>2</sub> was carried out in different tissues of the circulatory pathway by the Ellman method and the Griess reaction respectively. **Results:** An increase in RV wall thickness (mm) was found in the MCT, CTRL + HVD and CARD groups with respect to CTRL group (P < 0.0001). In general, a lower ganglia density, size and lower number of fibers were found in the groups MCT, CTRL + HVD and CARD compared to the CTRL group. In the sympathetic and parasympathetic evaluation of the qualitative analysis the tissue impregnation was diminished too, which is correlated with neuronal degeneration. Regarding the quantification of AchE, differences were found in all the tissues of all groups with a decreasing trend from the CTRL group to the CARD group. NO<sub>2</sub> quantification showed the same decreasing trend for both ventricles, lung and serum. **Conclusion:** The present study shows quantitative and qualitative evidence that reflects the degeneration of the intrinsic innervation of the RV in pathological conditions such as hypertrophy and HF. Since the remodeling of the ICNS is different as the pathophysiological process progresses from hypertrophy to HF, it is suggested that this degeneration is time-dependent and can even be seen reflected in other tissues and cardiac chambers.

## 2. Introducción

La *insuficiencia cardiaca ventricular derecha (ICVD)* es un síndrome clínico complejo con una alta tasa de morbilidad a nivel mundial y continúa siendo la primera causa de mortalidad entre los pacientes con hipertensión arterial pulmonar (Hemnes et al., 2018). Además, tiene una amplia etiología ya que cualquier cardiopatía puede culminar en IC de ventrículo derecho, y la transición desde un estado adaptativo como la *hipertrofia* a la descompensación y manifestación clínica de fallo cardiaco depende de la severidad del estímulo presente, el tiempo de evolución, y alteraciones a nivel cardiaco; principalmente *remodelación adversa* y disfunción neuronal.

El *ventrículo derecho (VD)* esta inervado por fibras del sistema nervioso autónomo y por el *sistema de inervación intrínseco cardiaco (SIIC)*; un conjunto de ganglios neuronales que forman plexos, distribuidos desde el epicardio hasta el endocardio en las cuatro cámaras cardiacas y cuya interacción con otras fibras resulta en la modulación de las funciones cardiovasculares (Wake y Brack, 2016). Sin embargo, en procesos fisiopatológicos como la hipertrofia e IC, la inervación intrínseca cardiaca puede verse severamente afectada resultando en disfunción o atenuación parasimpática, hiperactividad simpática y una serie de cambios en la función eléctrica del corazón que predisponen a arritmias cardíacas letales y muerte súbita cardiaca (Tomaselli y Zipes, 2004).

*La monocrotalina (MCT)* es un alcaloide de pirrolizidina que se encuentra en la planta *Crotalaria Spectabilis*; es un toxico que tras su ingestión causa daño hepático e hipertensión pulmonar, que eventualmente resulta en hipertrofia y disfunción del *ventrículo derecho (VD)* (Gómez Arroyo et al., 2012). Este ha sido uno de los modelos más utilizados en la investigación cardiovascular dentro de los últimos 50 años (Hill, Gillespie y McMurtry, 2017), debido a su gran reproducibilidad y bajo costo. Varias investigaciones han demostrado su utilidad para evaluar la inervación del VD en la IC (Yamada et al., 1991; Chen et al., 2001; Kimura, Ieda, and y Fukuda, 2012; Ceconi et al., 1989; Leineweber, Seyfarth y Brodde, 2000), por lo que en esta investigación se utilizara el modelo de hipertrofia e IC inducida por MCT con el fin de estudiar la remodelación del sistema de inervación intrínseco cardiaco en VD durante la hipertrofia y su evolución

a IC, por medio de técnicas histológicas y una modificación del método de Ellman et al., 1961, para la cuantificación de marcadores parasimpáticos, y así comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos neuronales que subyacen en este síndrome clínico.

### **3. Antecedentes**

#### **3.1 Antecedentes generales**

##### **3.1.1 Morfología y fisiología del ventrículo derecho**

El *ventrículo derecho (VD)* es una de las cuatro cámaras cardiacas; embriológicamente se origina del *mesénquima cardiogénico* y tiene una amplia variedad de características tanto morfológicas como funcionales que lo diferencian de las otras cavidades. Está ubicado en la parte más anterior del corazón, justo detrás del esternón, y dentro de sus características anatómicas se encuentran: su morfología triangular, el grosor de su pared de 3 a 5 mm, pesa aproximadamente de 40 a 50 g, y tiene un volumen mayor (15 %) en comparación con el *ventrículo izquierdo (VI)* en el humano (Sanz, Sánchez, Bossone, Bogaard y Naeije, 2019). A nivel interno, el *ventrículo derecho* tiene ciertas estructuras que lo caracterizan y que son específicas de la propia cavidad como la *válvula tricúspide* relacionada con el tracto de entrada o *seno* formando un ángulo de aproximadamente 60° con el ápex trabeculado, y el tracto de salida o *cono*, que está limitado por la *válvula pulmonar* (Wang, Rai, Carrasco, Odusina, Salandy, Gielecki, Zurada y Loukas, 2019).

La fisiología ventricular derecha es compleja, y hasta hace pocos años su estudio tomó mayor impacto en la investigación, ya que el VI había sido más estudiado debido a su mayor impacto en la hemodinámica, fisiología y fisiopatología cardiaca. La función ventricular derecha es múltiple y puede verse afectada por diferentes factores; sin embargo, esta cámara generalmente se distingue por generar una menor *presión sistólica y diastólica* durante el ciclo cardiaco al estar acoplada a un circuito de baja resistencia en comparación con el VI. Debido a que la cavidad ventricular derecha está acoplada con la *aurícula derecha* y esta recibe sangre que proviene del retorno venoso, el cual está en constante cambio, el VD tiene la característica de ser más resistente a modificaciones en la carga de volumen y a la

isquemia, ya que el proceso de perfusión tiene la cualidad de llevarse a cabo durante la *diástole* y la *sístole* (Wang et al., 2019).

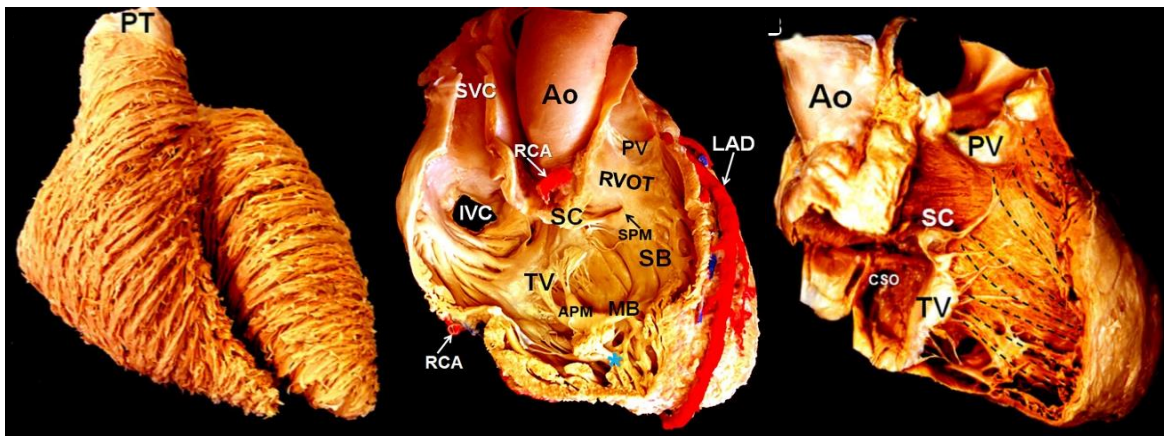


Fig. 1. Anatomía del VD. Muestra de la disposición de las capas superficiales del VD y VI (Izquierda). Disección de un corazón al quitar la pared libre del VD (centro). Muestra de agregados de miocitos subendocárdicos dispuestos longitudinalmente (líneas negras discontinuas en la imagen central). CSO: ostium del seno coronario, VI: ventrículo izquierdo, PT tronco pulmonar, válvula tricúspide (TV), ápice trabecular (\*), Ao: aorta, APM: músculo papilar anterior, IVC: vena cava inferior, LAD: arteria descendente anterior izquierda, MB: banda moderadora, PA: arteria pulmonar, PV: válvula pulmonar, RCA: arteria coronaria derecha, RV: ventrículo derecho, RVOT: tracto de salida del ventrículo derecho, SB: banda septomarginal, SC: cresta supraventricular, SPM músculo papilar septal, SVC vena cava superior; TV válvula tricúspide. Sanz et al., 2019

### 3.1.2 Inervación extrínseca cardiaca

La función cardiaca se encuentra regulada por fibras simpáticas, parasimpáticas y sensitivas que pertenecen al sistema nervioso autónomo. En condiciones fisiológicas, la función de estas fibras se encuentra en equilibrio para mantener la respuesta cardiaca a diferentes estímulos y situaciones, por lo que esta interacción entre el corazón y su inervación está relacionada con centros reguladores superiores de la función cardiovascular localizados a nivel del tallo cerebral en un área bilateral, en la sustancia reticular del bulbo raquídeo y en el tercio inferior de la protuberancia. Este *centro de regulación cardiovascular* recibe impulsos aferentes sensitivos para integrar la información que proviene del sistema cardiovascular, transmite impulsos parasimpáticos a partir de neuronas del núcleo ambiguo, que dan origen a fibras eferentes del *nervio vago* para inervar al corazón, así como impulsos simpáticos a través de las neuronas preganglionares de la asta intermediolateral de la médula espinal y de allí a los nervios simpáticos periféricos, llegando este control virtualmente a

todas las arterias, arteriolas, venas y al corazón (Wink, Delft, Notenboom, Wouters, DeRuiter, Plevier y Jongbloed, 2020).

La *inervación parasimpática cardíaca* tiene su origen a partir de diversas ramas del nervio vago que emerge fuera del bulbo, sale del cráneo junto con los pares craneales IX y XI por el agujero yugular donde se engruesa para formar el ganglio yugular o superior, posteriormente desciende verticalmente mostrando junto a la base del cráneo otro engrosamiento denominado ganglio plexiforme (ganglio inferior), desciende por el cuello y en el lado derecho el nervio discurre anterior a la arteria subclavia y penetra en el tórax para formar el plexo esofágico y unirse con el nervio del otro lado formando los troncos vagales anterior y posterior. En el lado izquierdo al entrar en el tórax, discurre entre las arterias carótida común y subclavia. Desde ahí, los nervios vagos (derecho e izquierdo) se desprenden ramas cardíacas que se unen con los nervios cardíacos superior, medio e inferior (provenientes de la cadena simpática) y conforman una aglomeración de fibras del sistema nervioso autónomo denominada plexo cardíaco, que se divide en porción superficial y porción profunda. Es en esta región donde terminan todas las fibras preganglionares parasimpáticas para hacer sinapsis con las fibras posganglionares e inervar al músculo cardíaco y a los nodos *sinusal* y *auriculoventricular*. (Iglesias y Estévez, 2008).

Al igual que las fibras parasimpáticas, las fibras simpáticas también están relacionadas con un área específica del centro de regulación cardiovascular denominada *área cardioaceleradora*, de donde descienden fibras para comunicarse con las neuronas preganglionares que se encuentran en las astas intermediolaterales de la médula espinal. Sus axones salen por las raíces anteriores de sus respectivos nervios y continúan por los ramos comunicantes blancos llegando a la cadena ganglionar paravertebral por la que ascienden muchos, sin hacer sinapsis, hasta los ganglios cervicales superior, medio e inferior y los primeros cuatro ganglios torácicos donde hacen sinapsis; las fibras que emergen de estos ganglios cervicales y torácicos constituyen las neuronas posganglionares simpáticas que después se dirigen al corazón por los tres nervios cardíacos para terminar en diferentes zonas del plexo cardíaco, arterias y nodos (Iglesias y Estévez, 2008).

### 3.1.3 Sistema de inervación intrínseco cardiaco

Tradicionalmente el estudio del control autonómico simpático y parasimpático cardiaco se ha enfocado en vías nerviosas centrales o se ha analizado a través de la estimulación eléctrica de nervios periféricos; sin embargo, en los últimos años se ha tomado mayor interés en la presencia de una red específica de fibras nerviosas y ganglios que a su vez forman plexos especializados de carácter intrínseco en el corazón. A este sistema comúnmente se le ha denominado *Sistema de inervación intrínseco cardiaco (SIIC)*, y tiene características específicas que lo diferencian de la inervación extrínseca al estar distribuido por diversas áreas de todo el corazón e interactuar constantemente junto con la inervación extrínseca para cumplir las demandas fisiológicas, eléctricas, mecánicas y hemodinámicas a nivel cardiovascular, etcétera.

La *inervación intrínseca cardiaca* se compone de colecciones de somas neuronales y fibras nerviosas interconectadas conocidas como plexos ganglionares cuyos somas suelen tener de 15 a 30 x 20 a 45  $\mu\text{m}$  de diámetro. La mayoría (aproximadamente el 90 %) de los somas residen en los tejidos supraventriculares o yacen planos sobre la superficie epicárdica, pero también pueden aparecer dentro de los depósitos grasos junto al hilio del corazón (Leger, Croll y Smith, 1999).

Los *ganglios intrínsecos* se encuentran principalmente en la superficie auricular dorsal, alrededor de la base de la aorta o de la arteria pulmonar; pueden localizarse en posición dorsal y ventral a las venas pulmonares, al igual que en la superficie ventricular anterior. Los campos de plexos ganglionares se han caracterizado por tener entre 5 a 7 regiones (dependiendo de la especie), tomando en cuenta el suministro nervioso y las proyecciones a diferentes sitios efectores. Estas regiones son: el atrio dorsal derecho (ADD), el atrio ventral derecho (AVD), el dorsal izquierdo (DI), el atrio ventral izquierdo (AVI), el dorsal medio (DM), el coronario derecho (CD) y el plexo coronario izquierdo (PCI) (Wake y Brack, 2016).

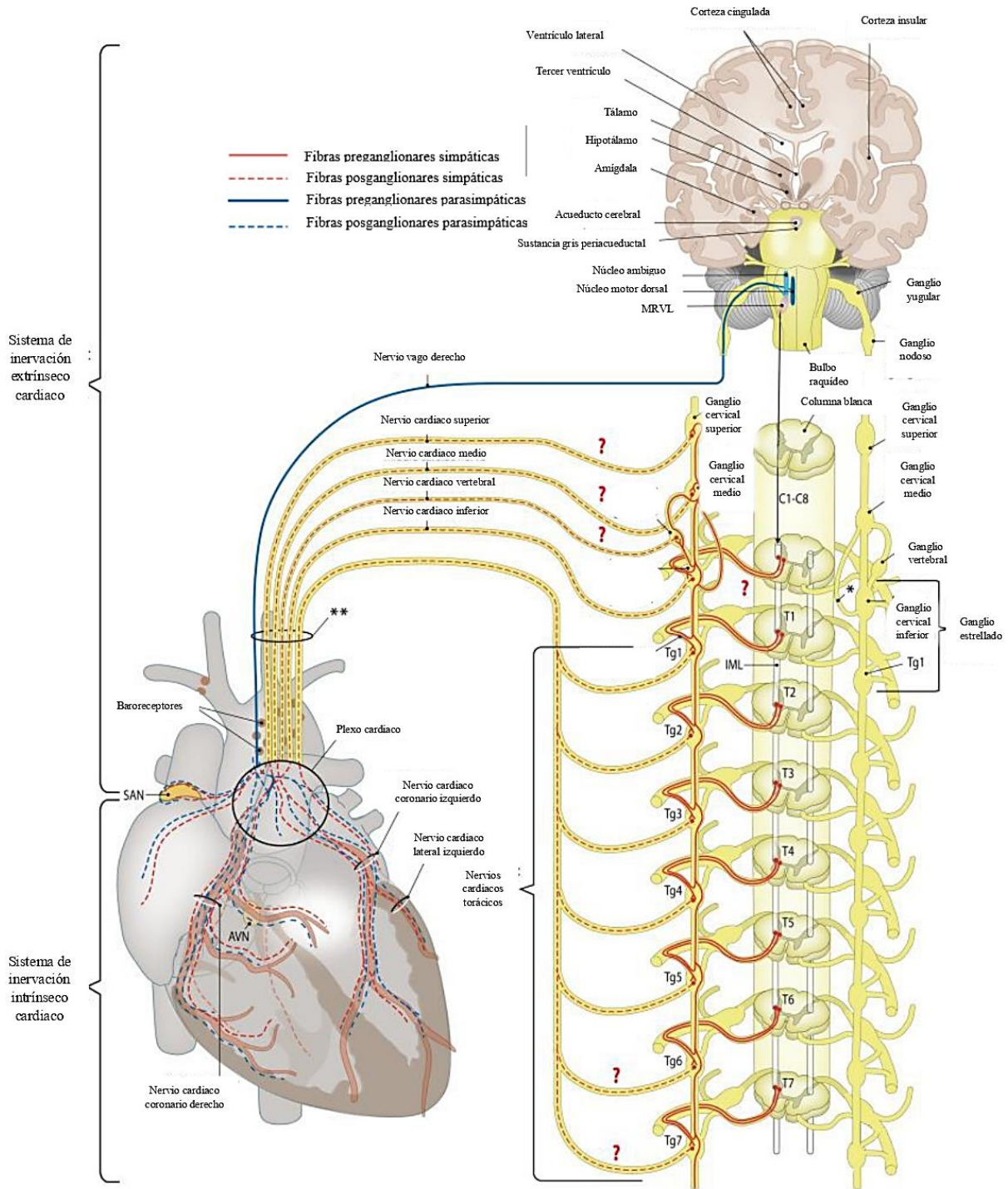


Fig. 2. Innervación cardíaca. Representación del sistema autónomo cardíaco. Representación de axones parasimpáticos preganglionares y posganglionares (azul) y simpáticos (rojo). A nivel cardíaco la innervación simpática y parasimpática converge para formar el plexo cardíaco. (?): estructuras anatómicas cuya existencia aún está en debate. \*ansa subclavia. \*\*nervios vagales y simpáticos se entremezclan antes de llegar al plexo cardíaco. Imagen traducida al español (Wink et al., 2020).

### 3.1.4 Inervación intrínseca del ventrículo derecho

Hace décadas se había creído que los ventrículos de mamíferos carecían de ganglios e inervación intrínseca; no fue sino hasta 1988 que Gagliardi et al, descubrieron la presencia de ganglios en el *miocardio ventricular* localizados de forma ventral a los surcos coronarios y a los alrededores del cono arterioso; esto después se corroboró en corazones humanos (Pauza, et al., 2000), de rata (Gómez et al., 2009), oveja (Saburkina et al., 2010), perro (Yuan et al., 1994), gato (Johnson et al., 2004) y conejo (Pauziene et al., 2016; Saburkina et al., 2014). (Wake, y Brack, 2016).

Las investigaciones precedentes acerca de la inervación intrínseca cardiaca derecha aún son controversiales y dispersas, ya que su estudio ha estado limitado a determinadas etapas del desarrollo cardiogénico o únicamente en zonas específicas del corazón. A pesar de eso, se han demostrado ciertos puntos de interés con respecto a la inervación ventricular derecha como lo es la abundante inervación de la zona anular de la válvula tricúspide, distribución y una configuración de fibras desde el epicardio hacia el endocardio cada vez más expuestas hacia el interior de la cavidad ventricular, una mayor densidad que se encuentra a nivel epicárdico caracterizada por ganglios rodeados de tejido adiposo o encapsulados por tejido conectivo, entre otros. Los ganglios intrínsecos cardiacos tienden a estar conformados por 2 hasta 200 o más células nerviosas en su mayoría multipolares o pseudounipolares con morfología ovalada o casi circular (Cho et al., 2019).

Para la cámara ventricular derecha existe una estrecha relación con el nodo *auriculoventricular* (AV), específicamente en la zona para-auriculoventricular a nivel epicárdico de donde se extienden grupos ganglionares en dirección inferior al surco coronario para inervar el miocardio ventricular derecho e izquierdo donde adquieren gradualmente una conformación más pequeña debido a una menor cantidad de neuronas (Singh et al., 1996). En el tejido ventricular se han localizado varios plexos ganglionares en la base de ambos ventrículos, por lo que los más relacionados con el VD podrían ser: el *plexo descendente anterior*, el *plexo descendente posterior* y el *plexo marginal agudo derecho* caracterizados por fibras de colágeno y fibroblastos adyacentes, con proyecciones de fibras mielínicas y

amielínicas, además de contar con un gran número de mitocondrias, complejos de Golgi y gránulos de lipofucsina (Armour, 2008).

Los conglomerados neuronales del VD han demostrado contar con la presencia de células gliales y una característica conformacional específica donde las neuronas cuyos somas son más grandes se distribuyen en la periferia ganglionar más próximos a la cápsula, mientras que los más pequeños están concentrados en el interior, en modelos porcinos (Arora et al., 2003). En el miocardio y endocardio ventricular derecho se han identificado ganglios conectados por una extensa red de fibras nerviosas tanto gruesas (6 a 10  $\mu\text{m}$ ) como delgadas (2 a 4  $\mu\text{m}$ ) lo que sugiere que los plexos ganglionares se distribuyen de manera similar en las cuatro cámaras y desde el epicardio hasta el endocardio (Gómez, Gordillo, López y Flores 2009).

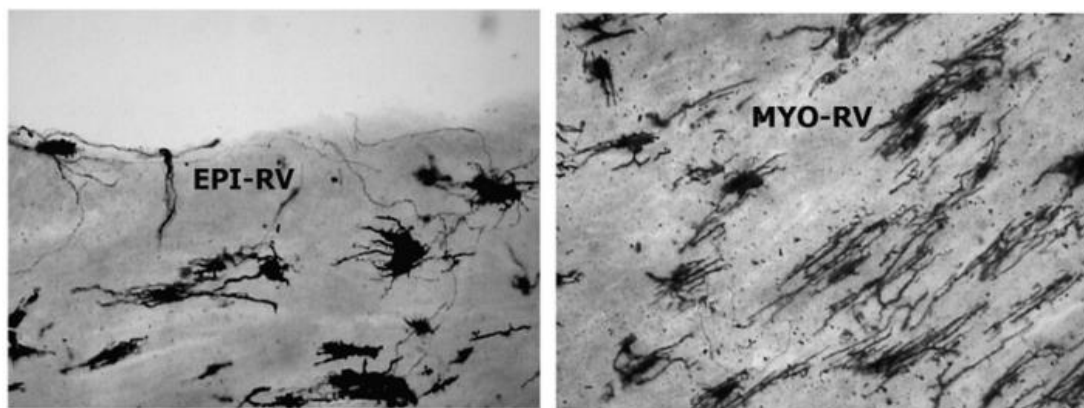


Fig. 3. Fotomicrografías de tejidos cardiacos procesadas por el método de Golgi-Cox. Ganglios cardiacos intrínsecos en el epicardio (izquierda) y miocardio del ventrículo derecho (derecha). MYO: miocardio, EPI: epicardio y RV: ventrículo derecho (Gómez et al., 2009).

### 3.1.5 Fenotipo neuroquímico

La naturaleza neuroquímica del SIIC es variada ya que se han encontrado células nerviosas capaces de liberar diferentes factores. En el caso de la inervación simpática del VD, esta se localiza a nivel superficial en el *subepicardio* cuyas fibras tienen una orientación perpendicular al *surco auriculoventricular derecho* o al surco interventricular anterior. Para el tracto de salida ventricular derecho, este recibe inervación adrenérgica proveniente de plexos próximos al origen de la arteria coronaria derecha (Ito y Zipes, 1994).

Las fibras colinérgicas están localizadas superficialmente a nivel del surco AV lateral derecho y penetran en el *miocardio* rápidamente, por lo que de 10 a 15 mm desde el surco AV ya se encuentran intramurales. El miocardio cercano a la *arteria descendente anterior* y el tracto de salida del VD reciben información colinérgica de la parte lateral del surco AV al igual que el surco descendente anterior (Ito y Zipes, 1994). Por otro lado, en corazones de roedor se ha demostrado la presencia de fibras nerviosas inmunorreactivas para ChAT cuando estas se han marcado previamente para *tirosina hidroxilasa (TH)*, por lo que se cree que algunas de las neuronas de los plexos ganglionares cuentan con la capacidad de liberar tanto *noradrenalina* como *acetilcolina* como una característica bifenotípica (Rysevaite et al., 2010).

Adicionalmente a los marcadores de inervación comunes simpáticos y parasimpáticos, las células que componen al SIIC tienen la capacidad de liberar otros cofactores necesarios para el mantenimiento de la función cardiovascular como: el *óxido nítrico (ON)* que se cree que las neuronas responsables de su liberación están co-localizadas con las neuronas colinérgicas (Brack et al., 2007), *péptido intestinal vasoactivo (VIP)*, que puede ser co-liberado con ACh (Parsons et al., 2006) y *neuropéptido Y (NPY)* liberado en conjunto con NA para modular el control simpático y parasimpático de la frecuencia cardíaca. A pesar de que estos dos últimos factores si están presentes en la inervación intrínseca cardíaca, aun no es clara su ubicación y densidad exacta.

Tanto el ventrículo derecho como las demás cámaras cardíacas cuentan con una serie de fibras aferentes que van a centros superiores y cuya función es detectar cambios en el medio, como: disminución en el aporte de oxígeno, disminución del flujo sanguíneo, cambios en la *frecuencia cardíaca (FC)*, *sobrecarga de presión* o volumen, etc. esto con la finalidad de mantener la correcta función cardíaca latido a latido. Estas vías aferentes comúnmente están relacionadas con factores como el *péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP)* y la *sustancia p (SP)*, dos neurotransmisores presentes en un patrón de fibras muy delgadas distribuidas por todo el corazón que después incrementan su diámetro de forma gradual para converger en el *hilio cardíaco* y ascender a los centros superiores.

El descubrimiento de los factores neurotróficos tiene su origen desde estudios que relacionan el número de fibras nerviosas existentes en un tejido y el área de inervación. *El*

*factor de crecimiento nervioso (NGF)* es un miembro de una familia de proteínas comúnmente denominadas neurotrofinas (NT), cuya característica común de estos factores de crecimiento es promover la supervivencia y la regeneración neuronal, sin embargo, fue hasta los últimos años que se investigó la posibilidad de que el músculo cardíaco sea un blanco directo (Ieda et al., 2004). Los efectos se desarrollan mediante la unión a sus receptores tipo tropomiosina cinasa de los cuales el tipo A (TrkA) es expresado a nivel neuronal. Una vez activados estos receptores se desencadena una cascada de reacciones que producen diferentes efectos como: aumento de tamaño celular (debido a una intensa actividad mitótica intracelular o a hipertrofia neuronal) y ramificación profusa de fibras (Levi-Montalcini et al., 1996). Las consecuencias de su actividad y liberación juegan un papel muy importante en el desarrollo de nuevas terminales nerviosas con fenotipos específicos además de estar relacionados con situaciones donde la arquitectura y función cardiovascular se encuentra comprometida y alterada como lo es en la *hipertrofia e insuficiencia cardíaca*; temas que se abordaran a continuación.

### **3.1.6 Alteraciones de la inervación intrínseca en los procesos fisiopatológicos**

#### **3.1.7 Insuficiencia cardíaca derecha**

La *insuficiencia cardíaca (IC)* es un síndrome clínico complejo caracterizado por la incapacidad del corazón para bombear los volúmenes adecuados de sangre y cumplir con las demandas metabólicas de un individuo. Desde un punto de vista fisiológico la IC se puede definir como un gasto cardíaco inadecuado para satisfacer las demandas metabólicas o un gasto cardíaco adecuado secundario a la activación neurohormonal compensatoria (que generalmente se manifiesta como un aumento de la presión de llenado ventricular).

Dentro de las múltiples clasificaciones del síndrome esta aquella basada en fracción de eyección ventricular: IC con fracción de eyección reducida (HFrEF) e IC con fracción de eyección preservada (HFpEF) (Savarese y Lund, 2017). Sin embargo, existen muchas otras clasificaciones globales basadas en la cámara afectada (ventricular o auricular derecha o izquierda), proceso de contractilidad o relajación afectado (sistólica o diastólica), la

incapacidad para realizar actividad física (A, B, C, D), entre otros. Este síndrome global es una de las áreas más estudiadas en la investigación biomédica básica y clínica cardiovascular y afecta alrededor de 26 millones de personas en todo el mundo (Ritter y Neyses, 2003). Actualmente cerca de 5 millones de americanos presentan IC y >250,000 mueren anualmente. Aunque se han desarrollado mejores técnicas de diagnóstico y tratamientos, la prognosis de los pacientes continúa siendo un problema debido a que el 20 % muere al cabo de un año posterior a su diagnóstico y el 80 % en los próximos 5 a 8 años.

La *insuficiencia cardiaca derecha (ICD)* es un síndrome multifactorial que afecta primordialmente al VD; diversas manifestaciones clínicas y cualquier cardiopatía que involucre al VD puede promover o culminar en su aparición como lo es: infarto ventricular derecho, hipertensión arterial e hipertensión pulmonar, miocardiopatía obstructiva crónica, insuficiencia o estenosis de la válvula tricúspide y/o pulmonar, miocardiopatía hipertrófica, diabetes mellitus, arteriopatías coronarias, insuficiencia de VI, síndrome de no compactación, entre otros. Estas manifestaciones tienden a desarrollar cambios estructurales a nivel cardiaco como lo es en la hipertrofia cardiaca patológica; un factor de riesgo determinante para que el corazón derecho desarrolle disfunción. Después del diagnóstico, las estimaciones de supervivencia son del 50 % y 10 % a los 5 y 10 años respectivamente (Roger, 2013).

Tras la aparición de daño inicial o procesos patológicos se desarrolla un proceso adaptativo denominado hipertrofia cardiaca, que al no tratarse de forma adecuada evoluciona a complicaciones más comprometedoras y culmina en una fase de descompensación hacia la insuficiencia cardiaca crónica en meses o años después, dependiendo de la severidad y naturaleza del estímulo generado. Estas alteraciones repercuten a nivel celular en los miocitos cardiacos generando una respuesta adaptativa al estímulo para mantener la función cardiovascular. Estos mismos cambios celulares comúnmente llevan a cambios estructurales y funcionales denominados en conjunto *remodelación cardiaca* (Kemp y Conte, 2012).

### **3.1.8 Remodelación ventricular**

El estrés hemodinámico crónico lleva a diferentes alteraciones y cambios en el tamaño, estructura, morfología y fisiología ventricular (Kemp y Conte, 2011), por lo que la remodelación puede presentarse en situaciones fisiológicas como el ejercicio (remodelación

fisiológica) o después de un insulto, lesión o proceso patológico (remodelación patológica). Comúnmente el proceso de remodelación inicia a partir de un punto funcional, donde los cambios más significativos se reflejan en la fisiología del VD, y conforme el proceso avanza, se da paso a un proceso de modificaciones a nivel estructural (Ritter y Neyes, 2003).

Las modificaciones funcionales emergen de lesiones y patologías siendo un ejemplo de ello la hipertensión pulmonar; enfermedad crónica caracterizada por un incremento en la *resistencia vascular pulmonar (RVP)*, incremento en la presión vascular pulmonar, fibrosis progresiva y cambios proliferativos en las arterias pulmonares que conducen a hipertrofia e insuficiencia ventricular derecha (IVD). Los modelos de *hipertensión pulmonar (HP)* inducida por bandas en la arteria pulmonar han posibilitado el análisis de alteraciones funcionales en la IC resaltando: alteraciones en las proteínas responsables del manejo de calcio, hiperaldosteronismo, estrés del retículo endoplásmico (RE), incremento en la contractilidad ventricular derecha, disminución en la elastancia arterial, desacople cardiopulmonar, apoptosis y aumento en el estrés oxidativo. Sin embargo, dentro de los últimos 30 años se ha acumulado evidencia del aumento en la actividad del sistema nervioso simpático (SNS) y su relación tanto en la *hipertrofia* como en la *insuficiencia cardíaca*. Por otro lado, también destacan los cambios en la expresión de ciertas proteínas como el factor de crecimiento nervioso (FCN), la densidad y función de fibras nerviosas, el factor inhibidor de leucemia y modificaciones en la concentración de catecolaminas a nivel plasmático y tisular; marcadores útiles para la evaluación de la inervación simpática (Aguero et al., 2014).

Las alteraciones a nivel estructural tienen la característica de presentarse posteriormente a una fase previa de remodelación funcional y son reconocidas en su mayoría por modificaciones en la arquitectura del VD (Kemp & Conte, 2011) a partir de: un engrosamiento de la pared ventricular a expensas del aumento en el tamaño de células cardíacas, incremento en el depósito de colágeno en la matriz extracelular que repercute en la *tensión intramiocárdica*, modificación en capilares y alteraciones en la fase diastólica y en la comunicación celular. En modelos de HP se han descrito modificaciones estructurales a nivel vascular como el engrosamiento de la pared vascular arterial que disminuye el lumen y la elasticidad vascular, así como también el flujo sanguíneo (Aguero et al., 2014). Sin

embargo, existen reportes que han demostrado la presencia de hipertrofia ventricular derecha (HVD) en ratas normotensas de la cepa Wistar Kyoto debido a causas genéticas, por lo que se han considerado como un modelo útil para el estudio de HVD e ICD (Pfeffer et al., 1979; Tomanek y Whitaker, 1990; Sebki et al., 1999; Aiello et al., 2003).

### **3.1.9 Remodelación nerviosa funcional en la hipertrofia e ICD**

En la insuficiencia cardíaca derecha, la inervación intrínseca cardíaca sufre cambios funcionales importantes, en general caracterizados por hiperactividad simpática y disfunción parasimpática. A nivel del tejido ventricular, el VD responde reduciendo la densidad de receptores beta-adrenérgicos y aumentando la expresión de receptores colinérgicos tanto nicotínicos como muscarínicos (da Silva et al., 2018). Por otro lado, alteraciones electrofisiológicas como la prolongación de los potenciales de acción, un sello distintivo de la insuficiencia cardíaca del VI, también se ha observado de manera constante en modelos de hipertrofia e IC de ventrículo derecho. Esta prolongación se refleja típicamente por una mayor duración del intervalo QT que puede estar relacionado con una disminución en la expresión de los canales de potasio (Benoist et al., 2011).

En el año 1982, Dalmo S, realizó una investigación en pacientes que presentaban miocardiopatía dilatada aplicando la técnica de hematoxilina y eosina donde concluyó que los pacientes que presentaban esta enfermedad presentaban un número disminuido de células nerviosas ganglionares por  $\text{mm}^2$ . Por otro lado, enfoques adicionales en la fisiología neuronal establecen que el NO en relación con la función contráctil cardíaca, está mal regulado en corazones con IC, caracterizado por una excesiva producción que va de la mano con la disfunción y depresión de la función cardíaca (Damy et al., 2004).

En relación a la inervación simpática, los resultados más consistentes de reportes en la literatura concuerdan con el fenómeno de reducción en los niveles de NE, TH, disminución en la recaptura de catecolaminas (Liang et al., 2000) y alteraciones en la expresión del *factor de crecimiento nervioso (FCN)* (Hassankhani et al., 1995), además de transdiferenciación colinérgica (Xie y Orkin, 2007). Este fenómeno de plasticidad o adaptabilidad de las células

simpáticas es el resultado de los cambios funcionales en el síndrome (Kimura, Ieda y Fakuda, 2012). Por otra parte, varias líneas de investigación han demostrado alteraciones en el control parasimpático con alteraciones en la regulación de la FC, disminución de *acetilcolinesterasa* y en la transmisión ganglionar vagal (Olshansky et al., 2008).

### **3.1.10 Remodelación nerviosa estructural en la hipertrofia e ICD**

La inervación intrínseca cardíaca derecha juega un papel muy importante en los procesos patológicos que afectan a las cámaras cardíacas derechas. Investigaciones relacionadas con este síndrome en el área de *neurocardiología* concuerdan en que los cambios más representativos a nivel nervioso son: *hipertrofia neuronal* y posterior disminución de fibras y células nerviosas (hipoinervación) conforme avanza el proceso fisiopatológico desde la hipertrofia hacia el fallo cardíaco.

Un mecanismo para modular las alteraciones neuronales a nivel cardíaco es a través de la liberación paracrina de FCN por neuronas parasimpáticas (Hasan y Smith, 2009), demostrando mediante técnicas de inmunohistoquímica la expresión de FCN en ganglios cardíacos. Se considera que esta proteína tiene propiedades neurotróficas y repercute en la supervivencia neuronal durante situaciones patológicas. Publicaciones de investigaciones en pacientes con fallo cardíaco realizadas por Sanjay Singh et al, en 2013, han demostrado un mecanismo de adaptación neuronal denominado anteriormente hipertrofia celular en el que las neuronas incrementan su tamaño y longitud, además de adquirir una apariencia edematosa; cambios que podrían ser el resultado de la liberación incrementada del FCN (Singh et al., 2013).

### **3.1.11 Alteraciones en los miocardiocitos**

Las células cardíacas son la unidad básica del funcionamiento eléctrico y mecánico cardíaco, sin embargo, también son células blanco que sufren una gran diversidad de

alteraciones en procesos fisiopatológicos. Hace algunos años, se estableció la hipótesis de que los cambios estructurales a nivel celular están relacionados con cambios anatómicos cardiacos, punto que después fue confirmado por Sinova y Gerdes en 1986. Posteriormente se relacionaron con mediadores químicos con acción pro hipertrofica como fenilefrina, angiotensina II, ET-1, entre otros, cuya expresión mal regulada desarrollaba alteraciones deletéreas en el funcionamiento y morfología cardiaca (Savinova y Gerdes, 2012). Otro de los estímulos adecuados para la liberación de estos factores es el estiramiento de los miocitos inducido por la *disfunción diastólica* y por sobrecarga de trabajo promoviendo la liberación de angiotensina I y II (Nadal-Ginart et al., 2003).

El *acople excitación contracción (AEC)* es uno de los procesos más importantes en la funcionalidad cardiaca e involucra varios elementos iónicos como el  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . En el caso del calcio, este ion es movilizado por todo el proceso de AEC mediante diferentes elementos como:  $\text{Ca}^+$  ATPasa, el RS y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  (NCX), que promueven su disminución a nivel citoplasmático en un 70 % aproximadamente. La  $\text{Ca}^+$  ATPasa del RS puede presentar una disminución de su expresión en relación con los bajos niveles de  $\text{Ca}^+$  dentro el RS, así como también un aumento en la expresión del NCX, sin embargo, estas alteraciones no han sido muy bien clarificadas lo que sugiere que la remodelación de estas estructuras puede depender del estado de la IC (Bers, 2006). En el caso del  $\text{Na}^+$ , las vías de influjo principales son el NCX, corriente de  $\text{Na}^+$  y NHE (Intercambiador sodio/hidrogeniones), con una participación de 66 %, 20 % y 5 % aproximadamente. Este ion tiende a presentar un incremento en la IC para promover la liberación de  $\text{Ca}^+$  del RS y mejorar la contractilidad miocárdica (Bers, 2006).

En las células cardiacas el número mitocondrial, la estructura, el recambio y la función están regulados por diferentes procesos, como la fusión y la mitofagia. Observaciones recientes han sugerido que las anomalías en estos procesos reguladores mitocondriales pueden contribuir a la patogénesis de la IC (Palaniyandi et al., 2010). La respiración mitocondrial anormal asociada con una mayor generación de ROS es otra característica fisiopatológica además de que las mitocondrias disfuncionales están asociadas con la desorganización estructural y la fragmentación de los orgánulos (Chen et al., 2009).

Los péptidos natriuréticos son importantes reguladores del balance hídrico, a través de natriuresis y diuresis regulando también el tono vascular. La expresión del *péptido natriurético auricular (ANP)* se produce mayoritariamente a nivel auricular y en menor cantidad a nivel ventricular, así como también el *péptido natriurético cerebral (BNP)* que se encuentra en la innervación auricular y en menor cantidad a nivel ventricular con la finalidad de antagonizar el eje *Renina angiotensina aldosterona (RAAS)*, disminuir los niveles de expresión de endotelina-1, fibrosis e hipertrofia, debido a su función heterogénea (Liang et al., 2007). El incremento en la expresión de estos péptidos y aumento de su liberación se presenta en situaciones de estrés patológico como en: hipertensión, isquemia e hipoxia, entre otros, y particularmente en el infarto al miocardio y en la IC ya que se asocia con aumento en la severidad de la enfermedad (Xu-Cai y Qingyu, 2009).

### **3.1.12 De la hipertrofia ventricular compensatoria a la insuficiencia cardiaca**

#### **3.1.12 Activación autonómica simpática**

La activación del *sistema nervioso simpático (SNS)* y la inhibición del sistema parasimpático han sido reconocidas durante mucho tiempo como manifestaciones del síndrome clínico de IC como consecuencia de los cambios hemodinámicos asociados con la alteración de la función cardiaca (Viorel y Cohn, 2014). Esta se manifiesta con el objetivo de mejorar la función cardiovascular en un proceso de compensación, sin embargo, mecanismos como este activados a largo plazo y sin una adecuada regulación pueden llevar a consecuencias adversas en la estructura y fisiología cardiaca (Triposkiadis et al., 2009).

La hiperactividad del sistema simpático está caracterizada por un incremento significativo en los niveles de NE a nivel plasmático (Pepper y Lee, 1999) además de un incremento en el tráfico vesicular simpático de fibras nerviosas, disminución de NE en el tejido cardiaco y reducción en la densidad de receptores postsinápticos beta adrenérgicos (Regitz et al., 1991). Esta alteración en los receptores beta adrenérgicos ( $\beta$ -AR) se caracteriza a nivel molecular por la reducción selectiva de su densidad en la membrana plasmática

(regulación negativa) y por el desacoplamiento de la membrana restante de  $\beta 1$ -AR y  $\beta 2$ -AR a las proteínas G (desensibilización funcional). Además, otra anomalía es la supresión en la función de los reflejos simpático-inhibitorios como el reflejo por barorreceptores arteriales, mientras que los reflejos simpático-excitatorios como el reflejo aferente simpático cardiaco y el reflejo quimiorreceptor arterial están hiperactivados (Watson et al., 2004).

Las *catecolaminas* liberadas durante la activación simpática tienen la capacidad de producir cardiotoxicidad en determinadas condiciones. Inyecciones intravenosas con isoproterenol o norepinefrina han confirmado la presencia de lesiones de bandas agudas de contracción atribuidas a hipoxia relativa, incremento en la permeabilidad sarcolémica, sobrecarga de calcio, elevación de AMPc, activación de receptores adrenérgicos alfa, y formación de metabolitos de catecolaminas oxidativos. La administración crónica de catecolaminas en ratas, ha demostrado promover la aparición de fibrosis, reducción de respuestas inotrópicas mediadas por adrenoreceptores beta, apoptosis de miocardiocitos y disfunción en el bombeo sanguíneo; principalmente a través de dilatación ventricular (Triposkiadis. et al., 2009).

Durante la presencia de alteraciones electrofisiológicas, el aumento del tono simpático causa una fuga diastólica de  $Ca^{2+}$  a través del receptor 2 de rianodina (RyR2), lo que resulta en aumentos localizados y transitorios de  $Ca^{2+}$  en los cardiomiocitos. Este incremento promueve la liberación de más calcio propagándose como ondas de  $Ca^{2+}$  las cuales pueden causar retrasos después de las despolarizaciones y originar latidos prematuros ventriculares al igual que *taquicardia ventricular (TV)* sostenida. A partir de esto, fenómenos como ondas T alternantes y prolongación del QT ha sido útiles en la clínica ya que dicha prolongación predispone a la génesis de post-despolarizaciones tempranas que al mismo tiempo funcionan como sustrato para la aparición de taquicardia, fibrilación ventricular y arritmias de reentrada (Kinoshita et al., 2003).

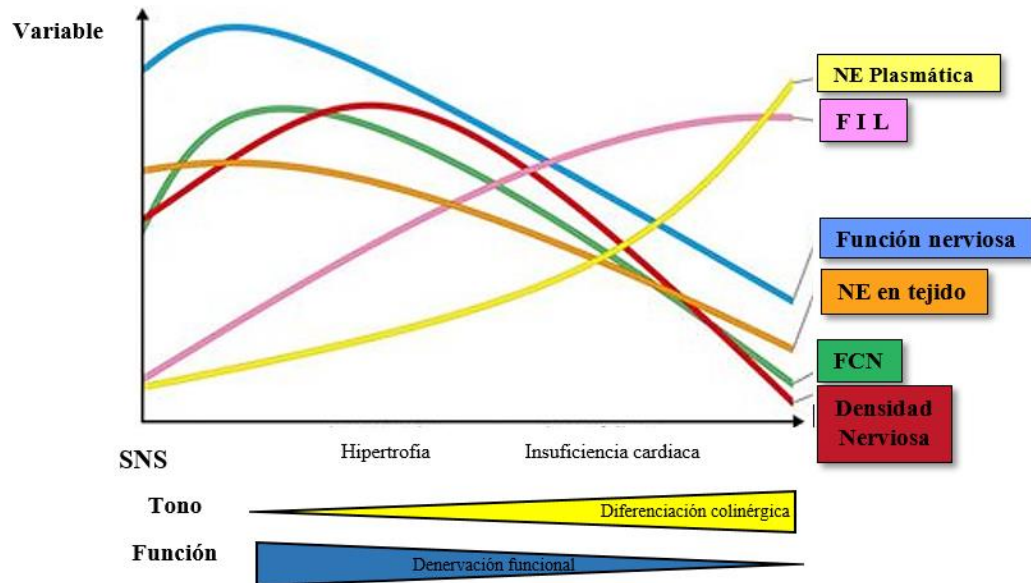


Fig. 4. Cambios temporales en la inervación cardíaca con progresión de la enfermedad. NE, norepinefrina. FCN, factor de crecimiento nervioso. FIL, factor inhibidor de leucemia. Imagen traducida al español (Fukuda et al., 2015).

### 3.1.13 Activación del eje renina-angiotensina-aldosterona

El *sistema renina-angiotensina (RAAS)* es un eje peptidérgico que participa en el control homeostático del sistema cardiovascular, renal y en la regulación del volumen de líquido extracelular (Patel et al., 2016). La actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) aumenta en pacientes con IC. Por lo tanto, esto se ve reflejado en las alteraciones del volumen sanguíneo, la presión arterial y la función cardiovascular. Su activación tiende a ser un mecanismo adaptativo presente en la remodelación a corto plazo para mantener la función cardíaca disminuida repentinamente, pero a largo plazo la estimulación crónica del RAAS conduce a la progresión de enfermedad ya que las acciones de la angiotensina II (Ang II) incluyen vasoconstricción, remodelación cardíaca, fibrosis, generación de endotelina y activación simpática (Unger y Li, 2004).

Se cree que la sobrecarga hemodinámica induce la activación del RAAS a nivel cardíaco y que la gravedad de la carga determina el alcance de la expresión del sistema. La expresión de ACE está relacionada con el pronóstico y la gravedad de la IC en el corazón humano, y la actividad de esta enzima se correlaciona con el estrés diastólico de la pared,

además de que los niveles de NE y Ang II estimulan la reabsorción de sodio en el túbulo proximal a nivel renal, lo que contribuye a la retención de líquidos. El eje RAAS tiene diferentes efectos adversos cuando el tejido cardiaco se somete a sobrecarga de presión como: inducción de hipertrofia, expresión de genes fetales, proliferación de fibroblastos, aumento en el depósito de colágeno, inflamación, trombosis y generación de especies reactivas de oxígeno. Además, este sistema también tiene la capacidad de cambiar las propiedades biofísicas de la membrana celular ya que la angiotensina II puede llegar a inhibir diferentes corrientes de potasio como e K<sup>+</sup> transitoria de lenta inactivación, corriente de potasio activada por calcio y la rectificadora tardía, todas promoviendo una prolongación en el potencial de acción y propiciando la aparición de alteraciones eléctricas (Tomaselli y Zipes, 2004).

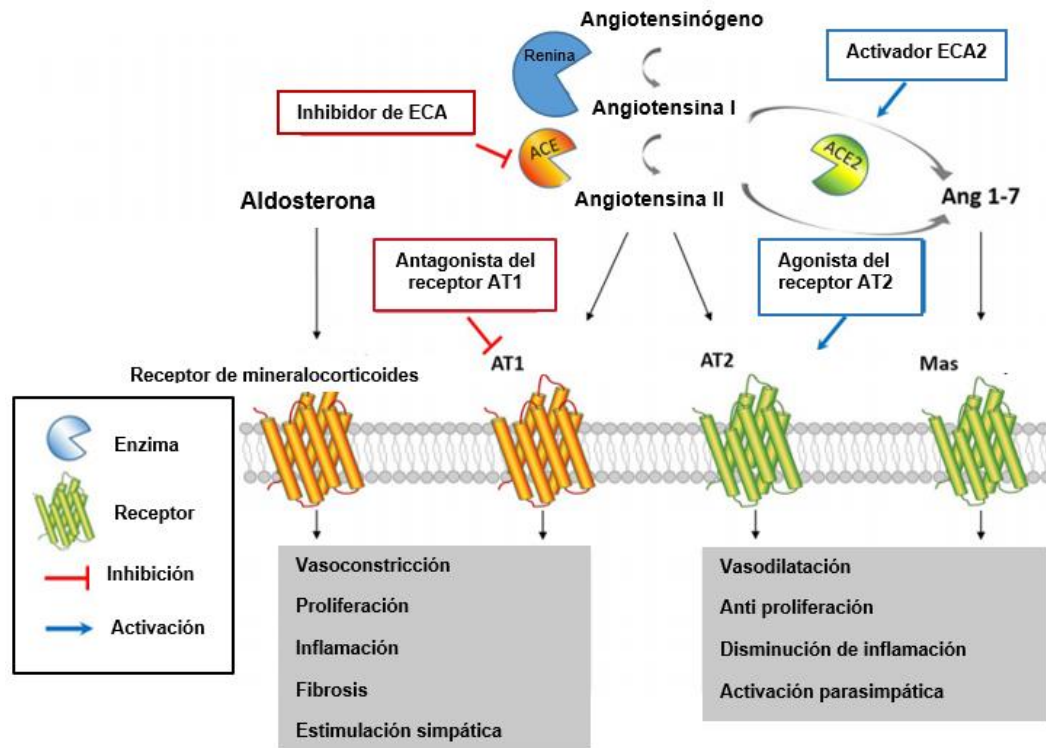


Fig. 5. Activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) en HAP. La renina convierte el angiotensinógeno en angiotensina I, que es procesada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el péptido biológicamente activo angiotensina II y se une a los receptores de angiotensina AT1 y AT2. La angiotensina I y II también pueden ser procesadas por ACE2 para producir angiotensina (1-7), que activa el receptor MAS. Por otro lado, la aldosterona activa los receptores de mineralocorticoides. Tanto la activación del receptor AT1 como el del mineralocorticoides conducen a la señalización patológica en la HAP, y atacar estas vías utilizando antagonistas del receptor o inhibidores de la ECA mejora la HAP. La señalización AT2 y Mas son protectoras, y la promoción de estas cascadas de señalización utilizando agonistas AT2 o activadores ACE2 mejora el desequilibrio neurohumoral presente en la HAP y en la IC (Vaillancourt, Chia y Sarji, 2017).

### 3.1.14 Activación de la respuesta inflamatoria

Las citocinas forman una amplia gama de proteínas farmacológicamente activas y de peso molecular relativamente bajo. Estas sustancias son secretadas por diferentes tipos de células con el fin de alterar su propia función (autocrina) o la de las células adyacentes (paracrina). Las más importantes o que están implicadas en la progresión de la disfunción cardíaca son el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), la interleucina 1 (IL-1) y la IL-6. Estas comparten algunas características y todas actúan en un sentido pro inflamatorio (Sydykov et al., 2018). Se cree que las catecolaminas juegan un papel importante en la activación de dichos factores y que la liberación es mayoritariamente de células mononucleares además de que posiblemente el mismo miocardio pueda participar en su liberación por medio de cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos y células inmunes infiltradas o de tejidos extracardíacos como tejido adiposo, intestino y órganos linfoides.

De acuerdo con la hipótesis de las citocinas, la IC progresa porque las citocinas exacerban las anomalías hemodinámicas o ejercen efectos tóxicos directos sobre el corazón por concentraciones incrementadas de IL-6 en la circulación (Seta et al., 1996). Por otro lado, la IL-1 está asociada con procesos de arritmogénesis y depresión en la capacidad contráctil miocárdica y para la IL-10 cuya función predominante es antiinflamatoria, se ha detectado con una actividad ligeramente disminuida en pacientes con fallo cardíaco (Anker y Haehling, 2004).

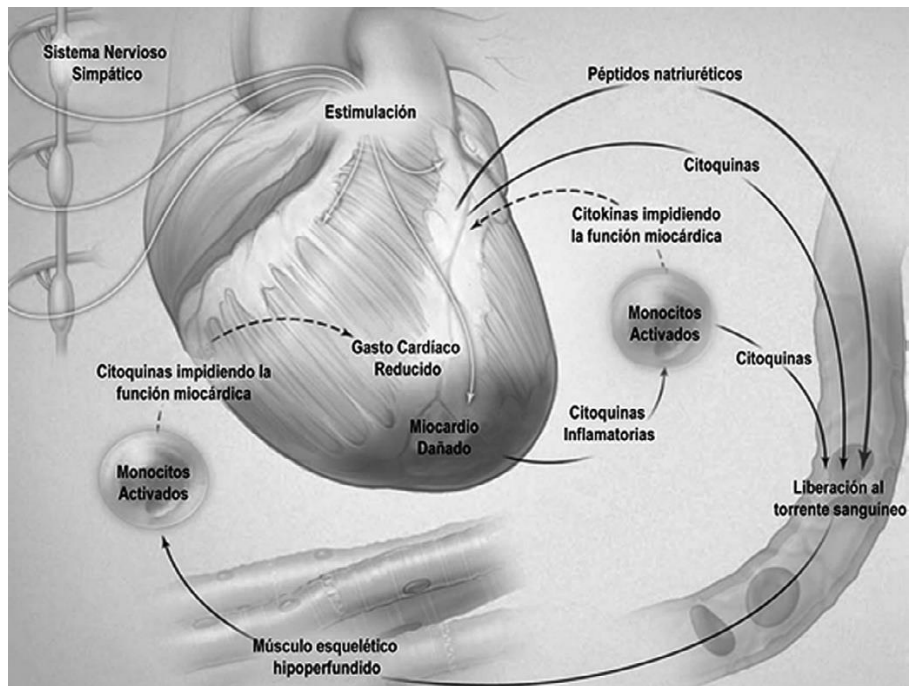


Fig. 6. La hipótesis de las citoquinas en la insuficiencia cardíaca. El miocardio dañado produce citoquinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , interleucina-1, interleucina-6 e interleucina-18); Esta producción se ve reforzada por la estimulación del sistema nervioso simpático. El miocardio lesionado, así como el músculo esquelético que está hipoperfundido debido al gasto cardíaco reducido, activa los monocitos para producir las mismas citocinas, que actúan y deterioran aún más la función miocárdica (líneas discontinuas). Las citocinas de estas diversas fuentes también se liberan en el torrente sanguíneo. El miocardio estresado libera péptidos natriuréticos, denotados en rojo; Su liberación mejora la circulación (Modificadi de Braunwald et al., 2008).

## 3.2 Antecedentes específicos

### 3.2.1 Monocrotalina: historia, naturaleza y toxicidad

Los *alcaloides pirrolizidínicos* (AP) y sus N-óxidos son un grupo amplio de metabolitos secundarios producidos por ciertas plantas; son parte de las estrategias defensivas de las especies vegetales que los producen. La molécula de AP comprende un heterociclo pirrolizidínico, con un grupo metilo y un sustituyente hidroxilo (necina). Existen 4 bases necinas básicas: platinecina, retronecina, heliotridina y otonecina. Dadas todas las combinaciones químicas posibles de estas estructuras, podría haber más de 600 moléculas

diferentes de alcaloides pirrolizidínicos y hasta el momento se han identificado más de 350 en diversas plantas de todo el mundo.

La *monocrotalina (MCT)* es un alcaloide de pirrolizidina y un toxico de la planta *Crotalaria spectabilis*, que ha sido utilizada como un ingrediente de un té de hierbas de consumo tradicional por nativos en la India Occidental desde hace muchos años (Maarman et al., 2013; Roeder y Wiedenfeld, 2013). Está presente en los tallos, hojas y semillas de dicha planta y en todas las otras plantas del género *crotalaria*. Su toxicidad es esencialmente hepática y cardiopulmonar, afectando tanto a animales como a seres humanos, además de que se sospecha que provoca cáncer en caso de exposición. Es importante destacar que, si se aplica tópicamente, no causa toxicidad localizada sin embargo causa lesiones en varios órganos después de la absorción y la bioactivación hepática.

En el hígado, la MCT puede sufrir varias reacciones químicas, lo que lleva a la producción de elementos tóxicos y no tóxicos. El mecanismo por el cual MCT causa HP incluye el metabolismo de MCT en el hígado por la enzima citocromo-P450 en derivados pirrólicos que inician la lesión endotelial en la vasculatura pulmonar. La lesión endotelial es la inicial desencadenante de vasculitis pulmonar y remodelación vascular pulmonar obstructiva, caracterizada por estrechamiento u obliteración de la luz vascular. La investigación histológica de la vasculatura pulmonar en HP muestra características como hiperplasia intimal, hipertrofia medial y engrosamiento de la adventicia lo que contribuye a un incremento en la resistencia vascular pulmonar afectando indirectamente al ventrículo derecho.

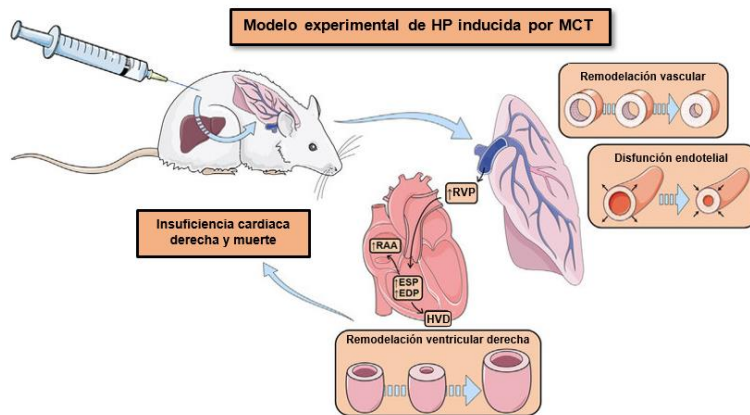


Fig. 7. Modelo experimental de HP inducida por monocrotalina. Posterior a la administración de monocrotalina, la rata desarrolla remodelación vascular y disfunción endotelial que llevara a un incremento en la resistencia vascular pulmonar (RVP) e hipertrofia de ventrículo derecho (HVD) e incremento en la presión telediastólica (EDP) y telesistólica (ESP) así como también incremento en el área auricular derecha (RAA). Debido al incremento progresivo en la resistencia vascular pulmonar, la función del VD se deteriora con el tiempo y eventualmente el animal muere de insuficiencia ventricular derecha. Imagen traducida al español (Santos et al., 2016).

### 3.2.2 El modelo de hipertrofia e insuficiencia cardíaca inducida por monocrotalina

Las investigaciones actuales han tomado un mayor interés en la experimentación con modelos animales de HP para comprender mejor sus características fisiopatológicas y así desarrollar y probar nuevos enfoques terapéuticos. Hace aproximadamente 50 años el único modelo utilizado comúnmente era la hipoxia crónica, que fue limitado por los hechos de que la hipoxia crónica contribuye mínimamente a la patogénesis de la HP y en contraste con otras formas de HP. Fue hasta después que Michael Kay describió junto con sus colegas el patólogo Donald Heath y el cardiólogo Peter Harris, que las semillas de *Crotalaria spectabilis* en polvo inducen PH en ratas siendo la MCT el agente activo (Hill, Gillespie y McMurtry, 2017).

Normalmente, el modelo de MCT se basa en una única inyección de MCT (generalmente 60 mg/kg) aplicada por vía intraperitoneal o subcutánea lo que resulta en el desarrollo de HP después de 3 a 4 semanas (Nogueira-Ferreira et al., 2015). Dentro de los otros múltiples cambios que se presentan tras la administración de este fármaco están: el

aumento en el peso del VD y en el tamaño de los miocitos cardiacos de 65 y 52 % respectivamente, incremento significativo de la presión sistólica del VD y la presión diastólica final en un 70 % y 94 % respectivamente, disminución del gasto cardiaco en un 28 % aproximadamente (Chen et al., 2001), incremento en la expresión del ARNm de péptido natriurético auricular, presencia de necrosis focal de miocitos e infiltración de leucocitos mononucleares, así como fibrosis temprana y aumento significativo (39 %) en la espesura de la pared vascular a nivel pulmonar (Chen et al., 2001).

La MCT también ha sido utilizada en la reproducción de uno de los más utilizados en la investigación cardiovascular para evaluar las alteraciones de la inervación intrínseca que se presenta en diferentes patologías; entre ellos la hipertrofia e insuficiencia cardiaca. En 1991, Yamada y colaboradores demostraron mediante cromatografía líquida de alta presión, las alteraciones que se presentan en ratas Wistar tras la alteración de monocrotalina desde la semana 1 a la 4, evaluando las cantidades de ACh y NE en todas las cámaras cardiacas concluyendo que el resultado es una depresión en los dos marcadores conforme evoluciona la enfermedad (Yamada et al., 1991). En el mismo año, Ishikawa y colaboradores demostraron por estudios de unión a radioligando que la densidad de los receptores beta adrenérgicos también se ve alterada en el tejido cardiaco a partir de las dos semanas de administración del fármaco a ratas de la cepa Sprague Dawley (Ishikawa et al., 1991). Estos resultados se correlacionan con la disminución en la densidad de receptores y de la recaptura de NE también demostrados por Liang y colaboradores, en el año 1989 donde también se demostraron datos claros de incremento de epinefrina y norepinefrina a nivel plasmático, pero disminución en los mismos en tejidos de ventrículo derecho de corazones de perros Mongrel (Liang et al., 1989).

Los parámetros funcionales de la inervación intrínseca cardiaca son otro de los puntos involucrados en la remodelación cardiaca. Para poder estudiar esto, se han adaptado metodologías que nos permitan evaluar la fisiología de la inervación simpática y parasimpática debido a que aún es poco claro cómo estos criterios cambian y se modifican a lo largo de la patología. La información que se tiene hasta ahora no ha sido suficiente para aclarar si tanto la inervación simpática como la parasimpática se modifican y sufren las mismas alteraciones simultáneamente o una de ellas puede estar disfuncional mientras la otra

esta hiperactiva. Por lo tanto, investigadores como Sayal et al., en 2012, aplicaron diferentes metodologías para evaluar la inervación desde el punto de vista funcional en modelos de IC por MCT.

Por medio de análisis por telemetría del dominio de frecuencia de los intervalos “RR” de un electrocardiograma, fue posible analizar la actividad y función nerviosa autonómica cardíaca en ratas con MCT, que evidenciaron una disminución de la VFC y disminución en los intervalos de alta frecuencia que corresponden a la actividad parasimpática con respecto a los de baja frecuencia que corresponden a la función simpática concluyendo que la hipertrofia e IC eventualmente causan trastornos de control nervioso autónomo cardíaco y degradación de vagal de terminaciones nerviosas (Sanyal et al., 2012). A pesar de que estos marcadores funcionales son importantes determinantes de la fisiología cardíaca, también están relacionados directamente con las alteraciones nerviosas estructurales en síndrome clínico de IC. Se ha demostrado por estudios de inmunohistoquímica que tanto la densidad como el número de axones y de fibras nerviosas presentan una reducción deletérea en la inervación miocárdica de VI en estadios tempranos de hipertrofia ventricular por sobrecarga de presión, lo que puede contribuir a la aparición de potenciales arritmogénicos en modelos de IC en ratón por constricción aortica (Muhlfeld et al., 2013).

GAP43 es una proteína útil como marcador para los conos de crecimiento neuronal; su expresión en los nervios simpáticos anatómicamente hiperinervados indica un brote de inervación en cardiomiocitos hipertróficos al igual que PSA-NCAM, otro marcador de neuronas inmaduras que generalmente se expresa en neuronas en etapa de desarrollo o neuronas regeneradas a partir de células madre neurales. La expresión de PSA-NCAM en la superficie celular desempeña un papel importante en varios eventos como: la migración celular, el crecimiento de neuritas y la ramificación nerviosa tanto en el sistema nervioso en desarrollo como en el adulto. Su expresión a nivel cerebral sugiere una etapa de mantenimiento o reaparición de un estado de desarrollo. A la inversa, también se sabe que existe un aumento de PSA-NCAM durante la reinervación después de una lesión en los nervios periféricos, por lo que varios estudios han demostrado que los cardiomiocitos hipertróficos expresan un patrón genético de fenotipo fetal (rejuvenecimiento) que incluye la expresión de proteínas contráctiles, canales iónicos, proteínas reguladas por  $Ca^{+}$  y moléculas

de producción de energía que causan disfunción miocárdica incluida la disminución de la velocidad de contracción, velocidad de relajación y la disminución de la producción de ATP. Aunque los mecanismos precisos que subyacen a estos cambios no están claros, los factores autocrinos/paracrinos de los cardiomiocitos son posibles mediadores de este rejuvenecimiento (Kimura. et al. 2007).

Un posible mecanismo molecular involucrado en la disfunción ventricular que acompaña a la HP grave es la composición de la matriz extracelular alterada y el contenido de colágeno fibrilar. La tenascina C es una proteína que sirve como marcador; es sintetizada por fibroblastos altamente expresados en tejidos embrionarios y regulados tanto por estrés mecánico como por mediadores neuroendocrinos en tejidos adultos bajo condiciones patológicas como el infarto de miocardio. Además, varias citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento y péptidos neurohumorales que estimulan la síntesis de tenascina-c, también participan en la disfunción miocárdica inducida por el MCT. La tenascina-c es un importante regulador de la matriz extracelular ya que induce la expresión de varias metaloproteinasas cuya activación está implicada en la remodelación cardíaca. Durante la IC, hay un aumento significativo en el contenido de colágeno intersticial miocárdico y en la expresión del gen tenascina-c a las seis semanas después de la inyección de MCT, lo que sugiere que los cambios en la composición de la matriz extracelular pueden estar participando en el deterioro tardío de la función del VD en la HP inducida por MCT (Correira et al., 2009).

Otro de los marcadores analizados en ratas administradas con monocrotalina es el ANP. Este péptido parece estar almacenado en gránulos auriculares como una gran molécula prohormona y se libera en la sangre durante la sobrecarga de volumen, y se sabe que la concentración plasmática de ANP está aumentada en pacientes y en ratas con insuficiencia cardíaca congestiva (Ceconi et al. 1989). Sin embargo, las concentraciones se han visto disminuidas a nivel auricular en un 85 %, lo que podría significar que el contenido de ANP en cada cámara del corazón presenta un agotamiento del péptido en ambas aurículas en relación con la gravedad de la IC. Por otro lado, en el ventrículo derecho hipertrofiado de ratas tratados con MCT el contenido de ANP se ha encontrado disminuido significativamente, probablemente debido al estiramiento crónico de la aurícula como consecuencia de la sobrecarga del VD. Esto implica que el estiramiento de la pared parietal

no es el único factor involucrado en la liberación del péptido y es posible que el aumento progresivo del tono simpático sea responsable de la pérdida del péptido en el tejido auricular (Comini et al., 1995).

En relación con la expresión de *factor de crecimiento nervioso* varias investigaciones han demostrado que la ET-1 incrementa específicamente la expresión de NGF en cardiomiocitos, además de que también contribuyen el estrés mecánico *in vitro* y la sobrecarga de presión *in vivo* presentes en la HVD inducida por MCT. Por lo tanto, para estudiar la inervación intrínseca del VD, el modelo de insuficiencia cardíaca inducida por MCT tiene ciertas ventajas para el estudio de este síndrome clínico; las principales ventajas son que el modelo evita la manipulación quirúrgica, tiene una alta reproducibilidad en poco tiempo a través de una sola inyección de MCT, es de bajo costo, además de no tener un efecto directo en el corazón como lo demuestran los estudios morfológicos que usan microscopía óptica y electrónica, sino que desarrolla sus efectos de forma indirecta a nivel pulmonar (Xing, Lu y Li, 2014).

#### **4. Justificación**

La hipertrofia ventricular derecha (HVD) e insuficiencia ventricular derecha (IVD) son dos condiciones que tienen una alta tasa de morbimortalidad a nivel mundial, y a pesar de estar muy relacionadas en los procesos patológicos cardíacos, estas cuentan con criterios tanto funcionales como estructurales que las diferencian a ambas. En el caso de la HVD esta se caracteriza funcionalmente por la activación del eje RAAS, liberación de endotelinas y de FCN, transición de señales mecánicas de sobrecarga a señales de crecimiento celular e incremento en la demanda de oxígeno miocárdico. En relación a los criterios estructurales se encuentra el aumento en el grosor de la pared libre del VD, hipertrofia neuronal y presencia de fibrosis. Por otro lado, la IVD es un síndrome que se presenta como resultado de la disfunción VD, y está caracterizada funcionalmente por hiperactividad adrenérgica, presencia de arritmias, disminución en la contractilidad miocárdica y gasto cardíaco e incremento en la presión intraventricular derecha. En cuanto a las características estructurales las más comunes son: dilatación y cambios en la morfología del VD, hipoinervación intrínseca cardíaca y desplazamiento septal. Todas estas alteraciones pueden presentarse por cualquier cardiopatía que afecte al ventrículo derecho, siendo una de ellas, la hipertensión pulmonar (HP). Aunque los tratamientos para esta patología tengan efectos benéficos en el ventrículo derecho, ninguno de ellos está enfocado en la IVD, que es la causa primaria de muerte entre los pacientes con HP. Dentro del proceso fisiopatológico, la inervación intrínseca cardíaca juega un papel importante, ya que esta puede verse severamente afectada llevando a consecuencias patológicamente graves como disfunción contráctil, muerte neuronal y alteraciones eléctricas, que favorecen la aparición de arritmias letales comprometiendo de forma significativa la supervivencia de un individuo. Ya que hoy en día aún es limitada la información relacionada con las alteraciones morfológicas y funcionales de la inervación intrínseca ventricular derecha en estas condiciones, este protocolo está enfocado en definir tales alteraciones y modificaciones morfológicas y funcionales del SIIC en la HVD e IVD, obteniendo una perspectiva importante para la comprensión de los mecanismos homeostáticos que subyacen en un ventrículo derecho sano y uno enfermo.

## **5. Planteamiento del problema**

El conocimiento del sistema de inervación intrínseco cardiaco en relación con su morfología, localización y fisiología es una herramienta importante para explicar la participación de las células nerviosas intrínsecas cardiacas en procesos patológicos compensatorios como la hipertrofia ventricular derecha y su evolución a una descompensación y desarrollo de insuficiencia cardiaca. Debido a la alta mortalidad, la información actual no ha sido suficiente para dilucidar todos los mecanismos que caracterizan a dicha fase de descompensación, lo que nos permitirá identificar factores de gran importancia pocos estudiados en la actualidad y que tienen gran impacto y relevancia en el síndrome clínico de IC.

## **6. Hipótesis científica**

Las alteraciones cardiovasculares del ventrículo derecho en la insuficiencia cardíaca inducida por monocrotalina, tienen una correlación significativa con modificaciones funcionales y estructurales de localización, distribución, y morfología en relación con el sistema de inervación intrínseco cardíaco, y difieren con el tiempo de evolución desde la fase de hipertrofia y su evolución a insuficiencia ventricular derecha en la rata Wistar Kyoto.

### **6.1 Hipótesis estadística**

**H<sub>0</sub>:** No existe diferencia en la inervación intrínseca del ventrículo derecho entre el grupo control versus el grupo con hipertrofia ventricular derecha

**H<sub>0</sub>:** No existe diferencia en la inervación intrínseca del ventrículo derecho entre el grupo control versus el grupo con cardiomegalia de ventrículo derecho

**H<sub>0</sub>:** No existe diferencia en la inervación intrínseca del ventrículo derecho entre el grupo con hipertrofia ventricular derecha versus el grupo con cardiomegalia de ventrículo derecho.

**H<sub>1</sub>:** Existe diferencia en la inervación intrínseca del ventrículo derecho entre el grupo control versus el grupo con hipertrofia y cardiomegalia ventricular derecha.

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general**

Llevar a cabo una caracterización de los cambios cualitativos y cuantitativos del SIIC durante el proceso de remodelación en la hipertrofia e IC derecha, por medio de la administración de monocrotalina en corazón de rata Wistar Kyoto.

### **7.2 Objetivos particulares**

1. Reproducir un modelo experimental de hipertrofia e insuficiencia cardiaca inducido por monocrotalina en corazón de rata Wistar Kyoto macho.
2. Analizar la localización y distribución cuantitativa (endocardio y miocardio) del SIIC en VD en un grupo control (CTRL), uno administrado con monocrotalina (MCT) un grupo control con hipertrofia previa (CTRL + HVD) y con cardiomegalia/insuficiencia cardiaca del VD (CARD) secundaria a HP por MCT mediante estudios histoquímicos generales de sistema nervioso: tinción Golgi-Cox.
3. Analizar cualitativamente las fibras del SIIC en VD en grupo control (CTRL), uno administrado con monocrotalina (MCT) un grupo control con hipertrofia previa (CTRL + HVD) y con cardiomegalia/insuficiencia cardiaca del VD (CARD) mediante estudios histoquímicos y de fluorescencia mediante la tinción de acetilcolinesterasa y ácido glioxílico como marcadores del sistema nervioso parasimpático y simpático respectivamente
4. Demostrar la diferencia en la inervación mediante cuantificación de Acetilcolinesterasa como marcador indirecto de inervación parasimpática de diferentes tejidos en grupo Control (CTRL), uno administrado con monocrotalina (MCT) un grupo control con hipertrofia previa (CTRL + HVD) y con cardiomegalia/insuficiencia cardiaca del VD (CARD) mediante técnicas colorimétricas por el método de Ellman.

5. Cuantificar nitritos como indicador de la inervación nitroergica de diferentes tejidos en un grupo control (CTRL), uno administrado con monocrotalina (MCT) un grupo control con hipertrofia previa (CTRL + HVD) y con cardiomegalia/insuficiencia cardiaca del VD (CARD) mediante técnicas colorimétricas por la reacción de Griess.
6. Demostrar la presencia de alteraciones hemodinámicas de la presión intraventricular sistólica y diastólica derecha en condiciones fisiológicas en un modelo control y un modelo problema para corroborar la presencia de hipertensión pulmonar mediante el uso de catéter adaptado a un transductor de presión.

## 8. Materiales y métodos

### 8.1 Modelo in vivo:

1. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar Kyoto machos adultos de 2 meses de edad con un peso aproximado de 200 g con corazón normal y corazones con hipertrofia cardiaca derecha usados como controles y otros dos grupos similares administrados cada uno con MCT.
2. Los criterios electrocardiográficos para la clasificación de los animales de experimentación estuvieron basados en el voltaje del complejo QRS teniendo en cuenta los siguientes rangos:

Tabla 1. *Criterios electrocardiográficos para la clasificación de la HVD*

CLASIFICACION DE LA HIPERTROFIA VENTRICULAR DERECHA	QRS	VOLTAJE (mV)
Normal	Positivo o isodifásico en DI	Menor a 200 mV
Hipertrofia leve	negativo	200 a 300 mV
Hipertrofia moderada	negativo	300 a 500 mV
Hipertrofia severa (mayor probabilidad de IC)	negativo	Mayor a 500 mV

3. Las ratas fueron utilizadas de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 así como también por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)

**Grupos de trabajo:** La población total fue de 32 ratas Wistar Kyoto divididas en 4 grupos de trabajo y con las siguientes características al inicio del protocolo:

CTRL n = 8 (corazón normal) MCT n = 8 (corazón normal)

CTRL + HVD n = 8 (corazón con hipertrofia moderada) CARD n = 8 (corazón con hipertrofia moderada).

## **8.2 Técnicas y procedimientos**

### **8.2.1 Registro electrocardiográfico**

El voltaje de los complejos QRS para evaluación de la hipertrofia e insuficiencia del ventrículo derecho se obtuvo mediante electrocardiograma. Se utilizó un método de detección no invasivo con la rata consciente mediante un sistema de 4 placas metálicas para cada pata del animal que funcionan como electrodos conectados a un osciloscopio PicoScope, Pico Technology® conectado a un amplificador de registro permitiendo obtener derivaciones bipolares DI, DII y DIII. Los registros se realizaron tomando en cuenta como derivación principal a DI. El sistema permite obtener el voltaje del complejo QRS, y la distancia en milisegundos del intervalo R-R para determinación de la FC:  $1000$  entre el promedio de los intervalos R-R en milisegundos y posteriormente se multiplica por  $60$ . El criterio para determinar la posibilidad de insuficiencia cardiaca fue un voltaje del complejo QRS mayor a  $500$  mV.

### **8.2.2 Administración del fármaco**

Se administró monocrotalina (Sigma-Aldrich) por vía intraperitoneal a una dosis de  $60$  mg/Kg a  $16$  ratas WK de dos meses de los grupos MCT y CARD. Se pesó a las ratas y se obtuvo un promedio de los pesos ( $200$  g). Por lo que se estableció una dosis global de aproximadamente  $16$  mg por cada modelo de experimentación. Se tomaron  $30$   $\mu$ L de HCL para disolver el fármaco en y posteriormente se neutralizó la solución con  $30$   $\mu$ L de NaOH usando una pipeta de  $200$   $\mu$ L (Eppendorf Research Plus). Se aforó la solución hasta llegar a  $300$   $\mu$ L con solución salina ( $240$   $\mu$ L restantes).

Para los grupos control se administraron únicamente  $300$   $\mu$ L de solución salina (CS PiSA) por vía intraperitoneal a cada una de los animales.

### **8.2.3 Sacrificio de los modelos de experimentación**

El sacrificio de los modelos de experimentación se llevó a cabo a las 4 semanas después de la administración por medio de anestesia con pentobarbital sódico (Pisabental presentación de 100 ml. PiSA, 60 mg/Kg). Se realizó toracotomía media con ayuda de una cama térmica (Premiere Slides Warmer XH-2002) y un ventilador para respiración artificial (Kent Scientific TOPO. Dual Mode Ventilator. Torrington, Connecticut, USA). Se retiró el corazón, se pesó en una balanza (A&D Company Limited). Posteriormente se montó en un sistema Langendorff para poder retirar la sangre restante con solución Krebs-Henseleit que contenía: NaCl 6.9 g, KCl 0.35 g, MgSO<sub>4</sub> 0.14 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.09 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.16 g, Glucosa 1.0 g, CaCl<sub>2</sub> 0.28 g y EDTA 0.1 g). Posteriormente el corazón se pesó primero en forma integral y después se seccionaron las cuatro cavidades para obtener el peso específicamente del VD, al cual se le midió el grosor de la pared libre ventricular. Se retiró adicionalmente el pulmón e hígado, los cuales se colocaron en hielo seco para preservarlos. Se obtuvo sangre en tubos de ensayo y se centrifugó (Centrífuga Hanil Science industrial) para obtener suero y preservarlo.

### **8.2.4 Histología**

#### **8.2.4 Tinción de Golgi-Cox**

La técnica de Golgi-Cox ha sido un método histológico de análisis para tejido neuronal desde hace muchos años, y a pesar de que se ha utilizado en su mayoría para el análisis del sistema nervioso central, existe una modificación de la técnica donde se utiliza cloruro de mercurio reemplazando el nitrato de plata (Rosoklija et al., 2003). Esta modificación posteriormente ha demostrado su utilidad para el análisis morfológico de la innervación intrínseca cardiaca (Gómez Villalobos et al., 2009; Trujillo et al., 2012). Esta técnica de impregnación neuronal tiene su fundamento en la formación de depósitos oscuros intracelulares de cromato de mercurio; producto de la reacción de cromación entre el bicromato de potasio y el cloruro de mercurio. A pesar de ser una técnica de impregnación pan-neuronal, la impregnación puede revelar la morfología neuronal mostrando a las células teñidas de color oscuro en un campo amarillo claro, visualizando cuerpos celulares, fibras

y ganglios intrínsecos cardíacos. Debido a su utilidad, esta técnica histológica utilizo en este protocolo para el estudio del SIIC en procesos fisiopatológicos como la HVD e IVD.

### **8.2.5 Técnica de acetilcolinesterasa en corazón por el método de Karnovsky**

La acetilcolinesterasa (AChE) pertenece a un grupo de enzimas denominadas colinesterasas, estas hidrolizan ésteres de colina presentes en el neurotransmisor acetilcolina. Esta enzima presenta dos sitios, uno aniónico que atrae por fuerzas electrostáticas al grupo amino de la Ach y otro sitio catalítico que rompe el enlace éster formando colina y acetato. La técnica de Karnovsky es un método histoquímico enfocado en la localización de AChE; tiene su fundamento en uso del grupo éster de la acetiltiocolina como un sustrato y este es hidrolizado por la acetilcolinesterasa presente en el tejido. Cuando la tiocolina es liberada, ésta reduce el ferricianuro a ferrocianuro el cual a su vez es precipitado por los iones de cobre como ferrocianuro de  $\text{Cu}^{++}$  formando un color café que se precipita en el tejido con una impregnación proporcional a la cantidad de AChE que se encuentre en el tejido. Este método fue utilizado marcador de inervación parasimpática de forma cualitativa en tejido de VD (Karnovsky y Roots, 1964). Adicionalmente se utilizó la técnica hematoxilina/eosina como una contraticnion para favorecer la visibilidad de los núcleos y cuerpos celulares miocárdicos.

### **8.2.6 Técnica de ácido glioxílico por el método de la Torre**

Loa neurotransmisores derivados de monoaminas, son elementos importantes en la función cardiovascular. Estos se derivan de aminoácidos como fenilalanina, tirosina y triptófano; tienen un grupo amino que está unido a un anillo aromático por una cadena de dos carbonos. Ya que las catecolaminas son sustancias biológicamente interesantes, se han desarrollado técnicas histológicas que permitan el análisis de estas aminas biógenas en diferentes tejidos, como el uso de ácido glioxílico como un método para la demostración histoquímica de la presencia de estos compuestos (Axelsson et al., 1973). Esta técnica continuó modificándose con el objetivo de mejorarla y poder aplicarla en cortes de tejidos en criostato (de la Torre y Surgeon, 1976). Su fundamento se basa en la ciclación de las cadenas

laterales de etilamina por aldehídos reactivos como el ácido glioxílico produciendo compuestos que tienen la capacidad de fluorescer bajo la iluminación apropiada (de la torre, 1980). Por lo que se utilizó esta técnica para demostrar la fluorescencia de catecolaminas en tejido de VD como un indicador cualitativo de la inervación simpática.

### **8.2.7 Cuantificación de marcadores de inervación por métodos colorimétricos**

La colorimetría es una de las técnicas empleadas con mayor asiduidad en los laboratorios de investigación. Esta técnica suministra información cualitativa y cuantitativa sobre sustancias en disolución. Las técnicas se basan en la medida de la absorción de radiación de la zona visible por sustancias coloreadas. En algunas ocasiones la muestra que deseamos determinar no poseen color por si mismas; en tal caso, es preciso llevar a cabo un desarrollo de color empleando reactivos que den lugar a sustancias coloreadas con la muestra que interesa estudiar.

### **8.2.7 Cuantificación de acetilcolinesterasa por el método de Ellman**

Hoy en día existen metodologías sofisticadas para la identificación cuantitativa de actividad enzimática, incluyendo la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) (inmunohistoquímica, microscopia inmunoeléctrica, técnicas de PCR, inmunoblot, ELISA, HPLC, entre otros). Sin embargo, muchas de estas técnicas son de alto coste, o solo pueden ser aplicadas con preparaciones especiales del tejido a estudiar (Cavallotti et al., 2000). A pesar de esto, existen técnicas que desde hace años han demostrado ser de gran utilidad en la cuantificación de esta enzima, como lo es el método colorimétrico de Ellman (Ellman, 1959). Esta técnica dos años más tarde fue modificada por el mismo autor brindándole más eficacia para la cuantificación de la actividad de AChE a través del tiempo en muestras pequeñas de homogenados de tejidos (Ellman et al., 1961). El principio de esta técnica se basa en que la tiocolina formada por la hidrólisis enzimática de la AChE reacciona rápidamente con un reactivo denominado DTNB (ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) liberando el compuesto 5-tio-2-nitrobenzoato, con un característico color amarillo proporcional a la actividad de la enzima. Posteriormente esta técnica fue aplicada en plasma (Voss y Sachsse, 1970; Nostrandt, Duncan y Padilla, 1993),

cerebro (Abdullah y Sakran, 2017) y tejidos periféricos incluyendo corazón (Leon et al., 2003). De acuerdo con esto, esta técnica fue aplicada en este protocolo para cuantificar la actividad de AChE en diversos tejidos como aurículas, ventrículos, pulmón, grandes vasos y suero con el objetivo de evaluar y analizar la inervación parasimpática en cada una de estas regiones desde un punto de vista cuantitativo.

### **8.2.8 Determinación de nitritos por la reacción de Griess**

El óxido nítrico es una molécula gaseosa y un radical libre que participa en una amplia variedad de procesos fisiológicos cardiacos (Massion et al., 2003; Sears et al., 2004; Farah et al., 2018) y en estados patológicos como la hipertrofia e IC (Haywood et al., 1996; Sharma et al., 2000; Damy et al., 2004). Debido a esto, ha existido gran interés en contar con métodos que permitan medir fácilmente la generación de esta molécula. Una forma indirecta de medir la producción de NO· es mediante la cuantificación de sus metabolitos estables: los nitritos (NO<sub>2</sub>). Aunque existen diferentes técnicas para su cuantificación como PCR, Western blot y HPLC entre otras, estas tienen la desventaja de ser poco accesibles y de alto costo. Sin embargo, existen otras técnicas como la reacción de Griess, que ha demostrado ser de gran utilidad en la práctica clínica para la cuantificación de nitritos como indicadores de la producción de óxido nítrico (Tsikas, 2007; Adames et al., 2009; Giustarini et al., 2009). Esta reacción se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida con nitritos de las muestras biológicas en medio ácido, produciendo una sal de diazonio que posteriormente reaccionara con aminas bicíclicas como la N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro formando un producto de diazonio de coloración morada que puede ser cuantificado por espectrofotometría a una absorbancia de 540 nm, es por eso que se decidió aplicar esta técnica en este protocolo para cuantificar nitritos en homogenados de diversos tejidos como aurículas, ventrículos, pulmón, suero y grandes vasos, como un indicador de la cantidad de ON en los tejidos y la probable inervación nitroérgica.

## **8.2.9 Estudio hemodinámico**

### **8.2.9 Presión intraventricular derecha**

El equipo de medición consta de un transductor de presión Grass P 23 X que se conecta con un catéter umbilical de poliuretano Fr.3.5 y a un sistema de registro PicoScope, Pico Technology® adaptado a una computadora, que una vez que censa los cambios de presión envía la señal de registro. El procedimiento quirúrgico para el registro se realizará siempre con anterior calibración del equipo mediante la introducción de solución salina al transductor de presión para limpiarlo y eliminar burbujas de aire, después mediante una llave de 3 vías en la entrada que va conectada directamente hacia la sonda de registro intracardiaco se conecta el tubo de insuflación de un baumanómetro, al tiempo que se observa en el monitor de la computadora un registro de la presión ejercida que debe ser igual a 0. Después se insufla el baumanómetro a 100 mm Hg y se corrobora que la línea basal mostrada se desplace en la misma medida.

Procedimiento: una vez anestesiada la rata con pentobarbital sódico 60 mg/kg más 500 UI de heparina por vía intraperitoneal se coloca en una cama térmica a 37 °C en posición supina fijando las 4 extremidades, se rasura la región torácica y se realiza una incisión medial cervical de 3 cm de longitud en la piel y músculo del área anterior del cuello con el fin de referir la tráquea. Una vez referida la tráquea se disecciona la región cervical lateral derecha y así encontrar y diseccionar la vena yugular interna derecha usando pinzas de disección e hisopos humedecidos en solución salina. Con cuidado de no manipular excesivamente el tejido para que no colapse el vaso, y teniendo una disección longitudinal de aproximadamente 1 cm, la vena yugular se liga en el extremo cefálico con seda trenzada 4 00, se pasa una segunda seda en el extremo caudal sin realizar la ligadura, una vez realizado este proceso con ayuda de pinzas oftalmológicas se sujeta el vaso y se corta en aproximadamente 1/3 de su circunferencia con el fin de crear un orificio y poder introducir el catéter el cual va a tener conexión mediante una llave de tres vías al transductor y otra a una jeringa con solución salina heparinizada. Una vez introducido el catéter este se introducirá en dirección caudal hasta llegar a la marca que nos indica el número 5. Cuando el catéter esté introducido se ligará de la porción caudal del vaso y se moverá ligeramente para poder analizar los trazos en el monitor del registro de presión. Se realizará una ligera succión en la jeringa con solución

salina heparinizada para confirmar que el catéter se encuentre permeable, que se corrobora con el paso de sangre hacia el catéter. Una vez conseguidos los registros de presión se retirará el catéter y se guardaran los datos en la computadora para posteriormente realizar el sacrificio del animal.

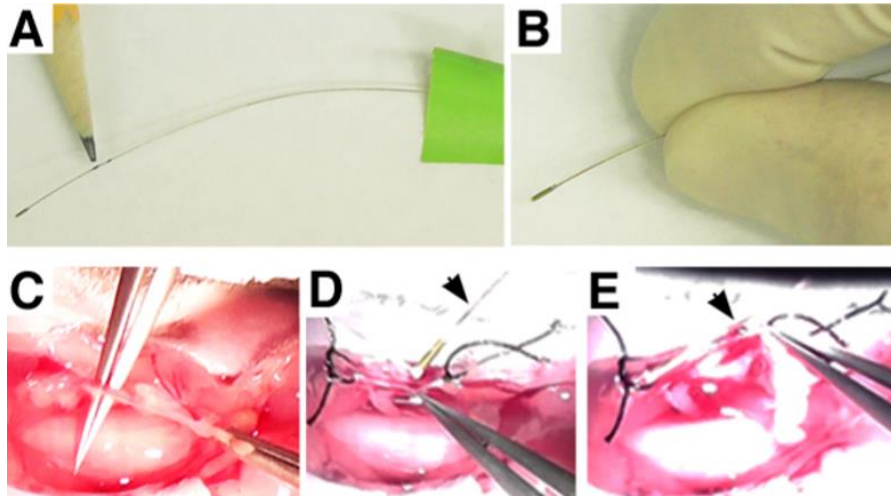
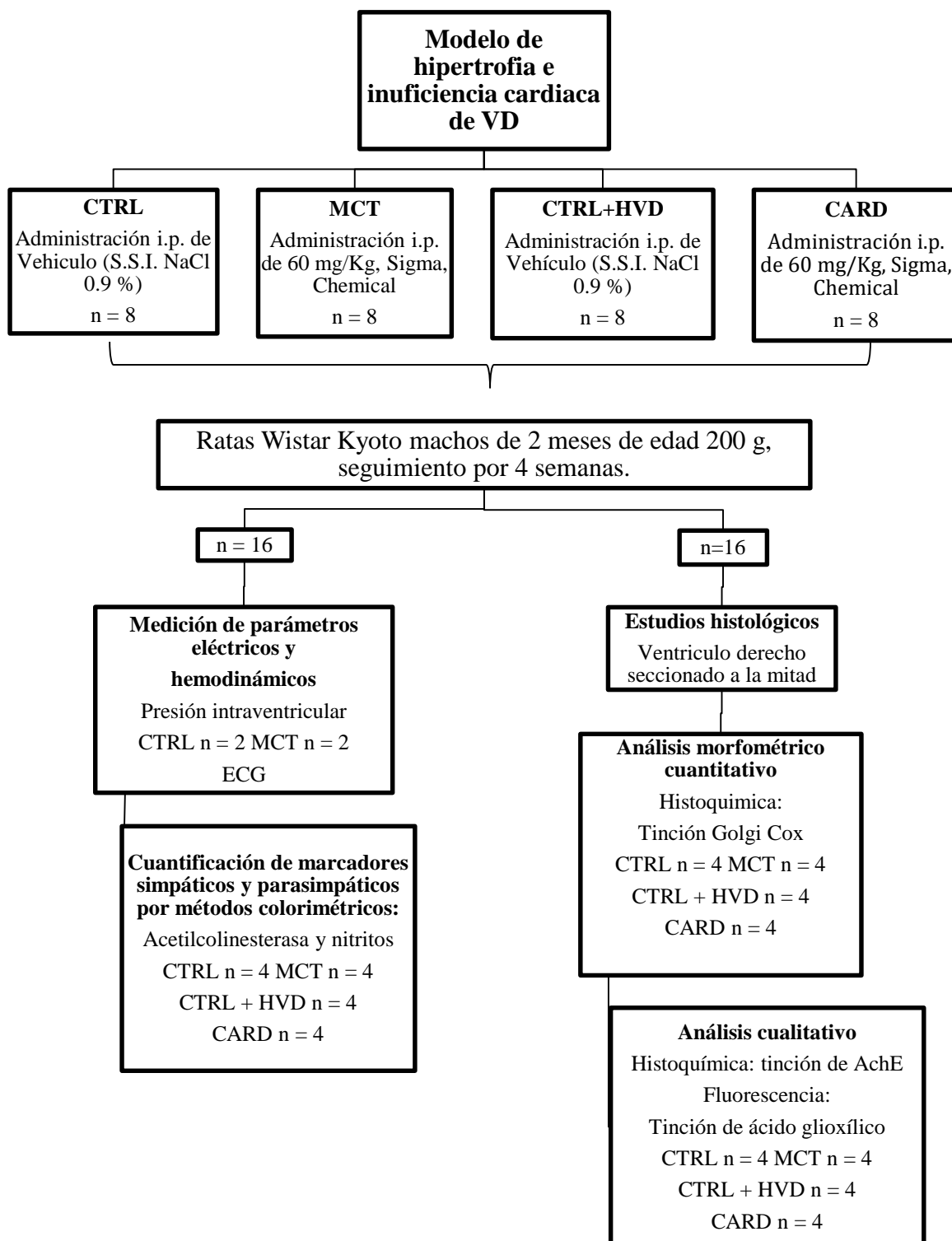


Fig. 8. Catéter del corazón derecho. El catéter del corazón derecho se muestra con marcas y cinta adhesiva (A), o se sujeta con la mano (B). El lápiz señala las marcas hechas en el catéter (A). Inserción del catéter (C-E): limpieza de la vena yugular derecha (C); vena suturada sostenida con fórceps, se avanza el catéter hacia un orificio previamente realizado en la vena (D); catéter después de la inserción en la vena (E). Las flechas apuntan al catéter (D, E). Chen, 2013.

### **8.3 Análisis estadístico**

Se llevó a cabo un análisis cualitativo para las técnicas histológicas. Los resultados se representaron en valores absolutos con el promedio  $\pm$  error estándar (ES). Los datos se analizaron por medio de una prueba ANOVA de una vía con una prueba post hoc Bonferroni para las comparaciones entre grupos con un nivel de significancia estadística de  $p \leq 0.05$ . Para la presentación de los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism 5.

## 8.4 Diagrama de trabajo

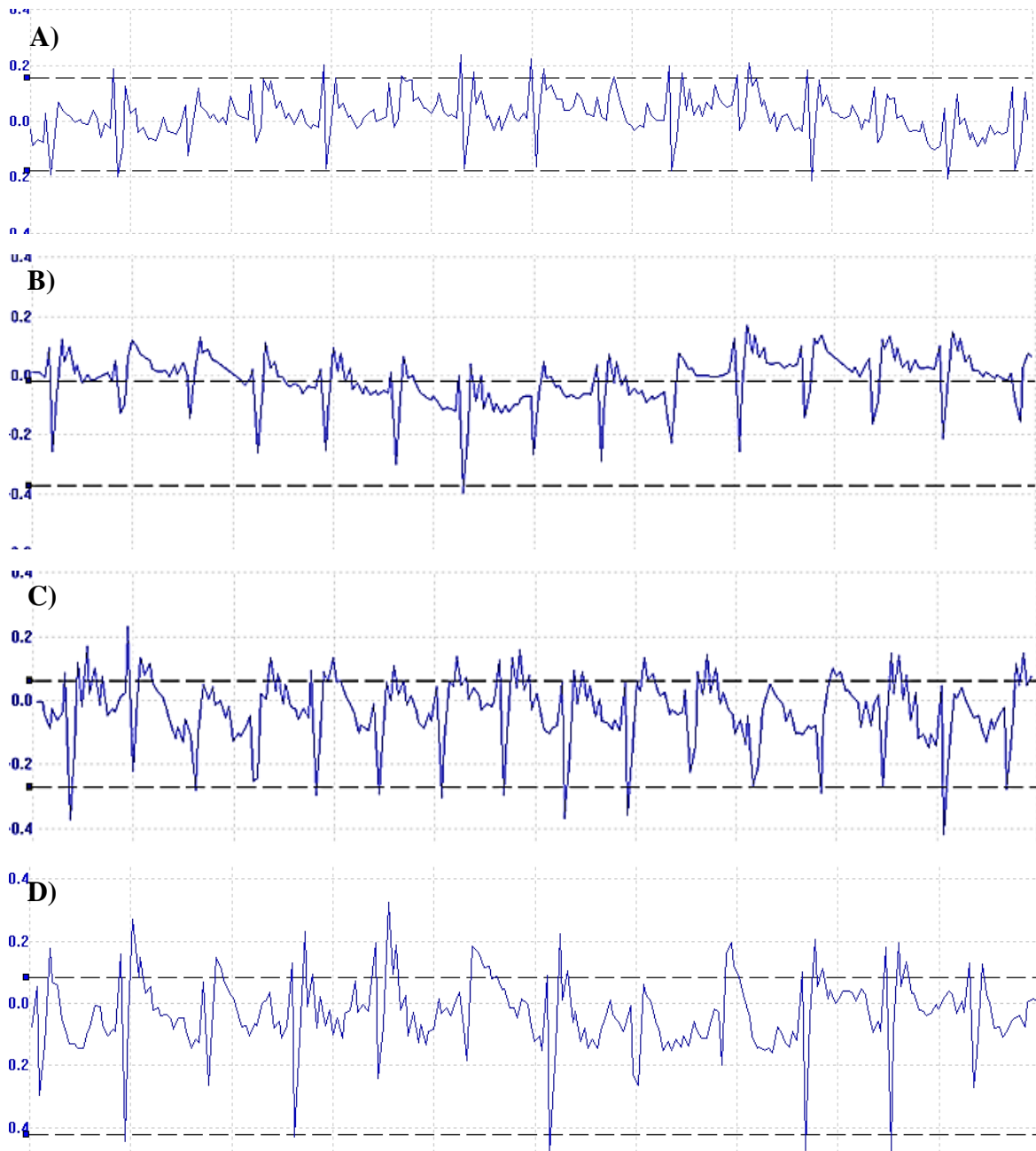


## **8.5 Bioética**

Este protocolo se desarrolló con base en los principios estipulados en el Código Núremberg y la declaración de Helsinki, donde se establece que todos los protocolos de experimentación deben realizarse primero en animales siempre justificando el uso para obtener mayor calidad de información que sea útil y relevante. También dicho protocolo estuvo desarrollado en relación con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de México (Norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999) para evitar el sufrimiento de los animales de experimentación y utilizar el mínimo número de animales necesarios aplicando la norma de las 3R's.

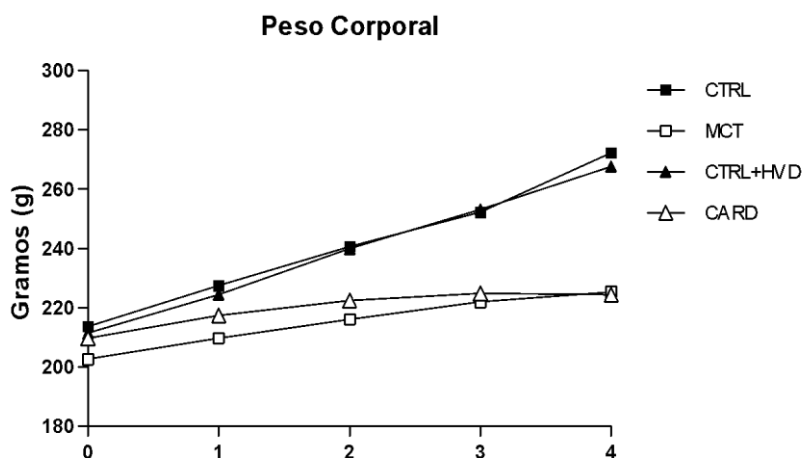
## 9. Resultados

### 9.1 Registros electrocardiográficos



**Fig. 9. Registros electrocardiográficos.** Registros típicos de electrocardiogramas registrados por la derivación DI. El registro del grupo CTRL (A) muestra un QRS isodifásico, con 232 mV, con tendencia a positividad, onda P visible, eje eléctrico normal y FC de 420 lpm. El registro del grupo MCT (B) tiene un QRS negativo con 334 mV, onda P visible, eje eléctrico desviado a la derecha y FC de 450 lpm. El registro del grupo CTRL + HVD (C) muestra un QRS negativo de 420 mV, eje eléctrico desviado a la derecha, y FC de 480 lpm. El registro del grupo CARD (D) muestra un QRS negativo, de 630 mV, eje eléctrico desviado a la derecha, onda P prominente y FC de 360 lpm.

## 9.2 Peso corporal, cardiaco y pulmonar

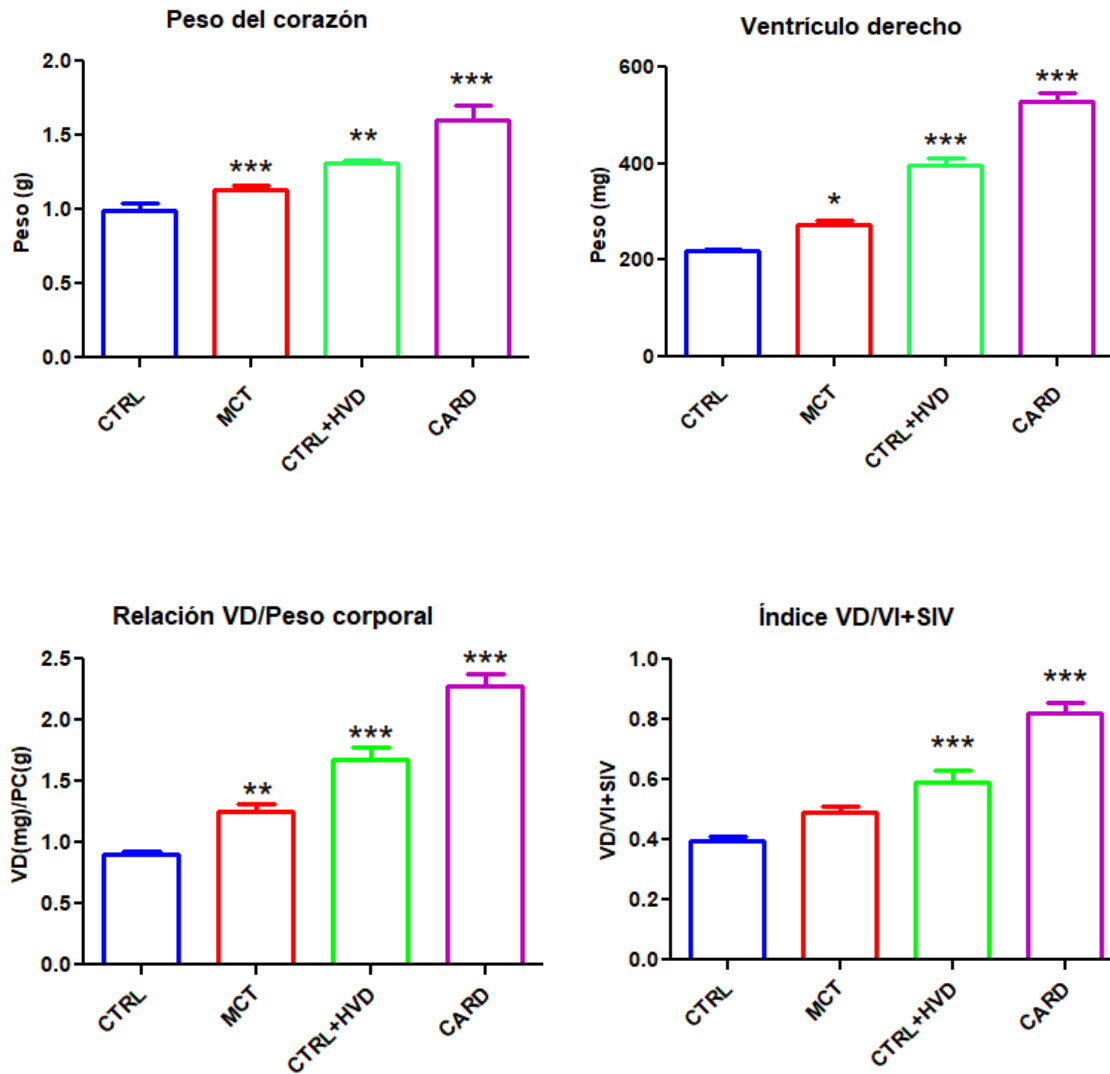


**Fig. 10. Peso corporal dependiente del tiempo de ratas registrado semanalmente.** Peso registrado durante las semanas (0-4) (CTRL, n = 8), ratas tratadas con monocrotalina (MCT) a 60 mg/kg de peso corporal (MCT, n = 15), ratas control con hipertrofia ventricular derecha (CTRL + HVD n = 8) y ratas con hipertrofia ventricular derecha administradas con MCT para desarrollar cardiomegalia (CARD n = 8). Los valores están representados en Media  $\pm$  EEM. Las diferencias de peso corporal entre las ratas MCT y CARD fueron significativamente diferentes a partir de la semana 1 y posteriormente. Se realizó una prueba ANOVA de una vía con una prueba post-hoc Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ).

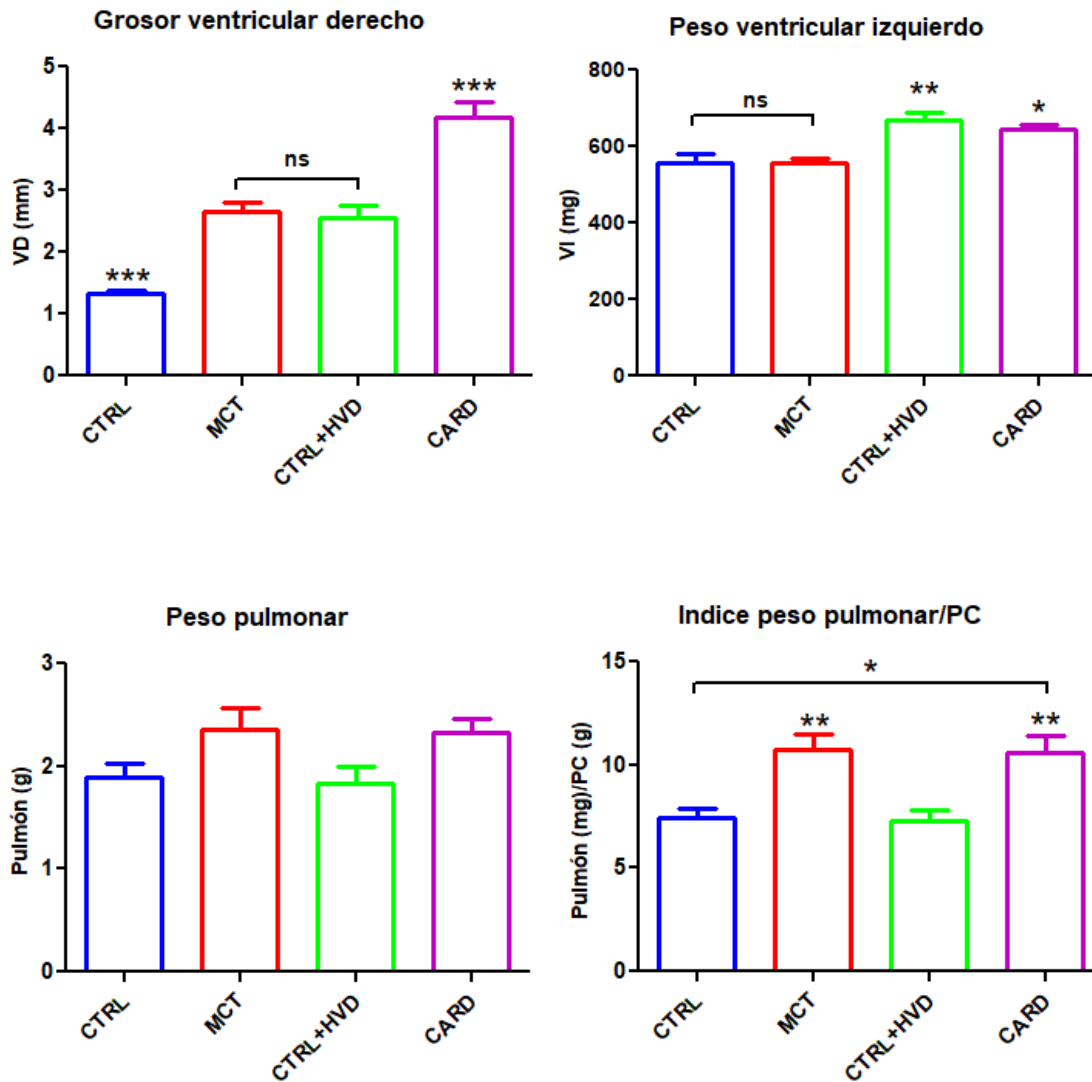
**Tabla 2. Características generales y cardiacas de CTRL, MCT, CTRL + HVD y CARD.**

	CTRL (n = 8)	MCT (n = 8)	CTRL+HVD (n = 8)	CARD (n = 8)
Peso corporal, g	272.3 $\pm$ 5.15	225.5 $\pm$ 4.54***	267.6 $\pm$ 5.04	224.3 $\pm$ 1.78†****
Peso del corazón, g	0.9938 $\pm$ 0.04	1.134 $\pm$ 0.03	1.308 $\pm$ 0.02	1.604 $\pm$ 0.09†****
Pc/Peso corporal, mg/g	3.833 $\pm$ 0.06	5.217 $\pm$ 0.28	5.360 $\pm$ 0.20	6.200 $\pm$ 0.28
VD, mg	219.2 $\pm$ 4.0	274.8 $\pm$ 7.4	400.0 $\pm$ 14.11	529.0 $\pm$ 17.5†****
VD/(VI + SIV)	0.39 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.04	0.82 $\pm$ 0.03
VD/Peso Corporal	0.8967 $\pm$ 0.02	1.257 $\pm$ 0.05	1.674 $\pm$ 0.10	2.280 $\pm$ 0.09†****
VD grosor, mm	2.125 $\pm$ 0.05	2.650 $\pm$ 0.14	2.563 $\pm$ 0.19	4.188 $\pm$ 0.24§§****
AD, mg	57.7 $\pm$ 3.8	67.2 $\pm$ 1.9	68.4 $\pm$ 1.7	140.4 $\pm$ 16.9†§****
VI, mg	555.7 $\pm$ 23.20	555.7 $\pm$ 14.38	669.0 $\pm$ 18.94	643.4 $\pm$ 13.41
Pulmón, g	1.90 $\pm$ 0.12	2.36 $\pm$ 0.19	1.83 $\pm$ 0.15	2.32 $\pm$ 0.14
Pulmón/Peso corporal, mg/g	7.42 $\pm$ 0.44	10.73 $\pm$ 0.72	7.27 $\pm$ 0.52	10.59 $\pm$ 0.81

Representación de los valores en Media  $\pm$  EEM. n, número de ratas por grupo. CTRL, control; MCT, monocrotalina 60 mg/kg, CTRL + HVD, control con hipertrofia ventricular derecha y CARD, cardiomegalia, VD, ventrículo derecho, VI, ventrículo izquierdo, SIV, septum interventricular. Se realizó una prueba ANOVA de una vía con un test post-hoc Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ). ns  $P > 0.05$ , \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  y \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ . † = vs CTRL, § = vs MCT, §§ = vs CTRL + HVD, ‡ = vs CARD.

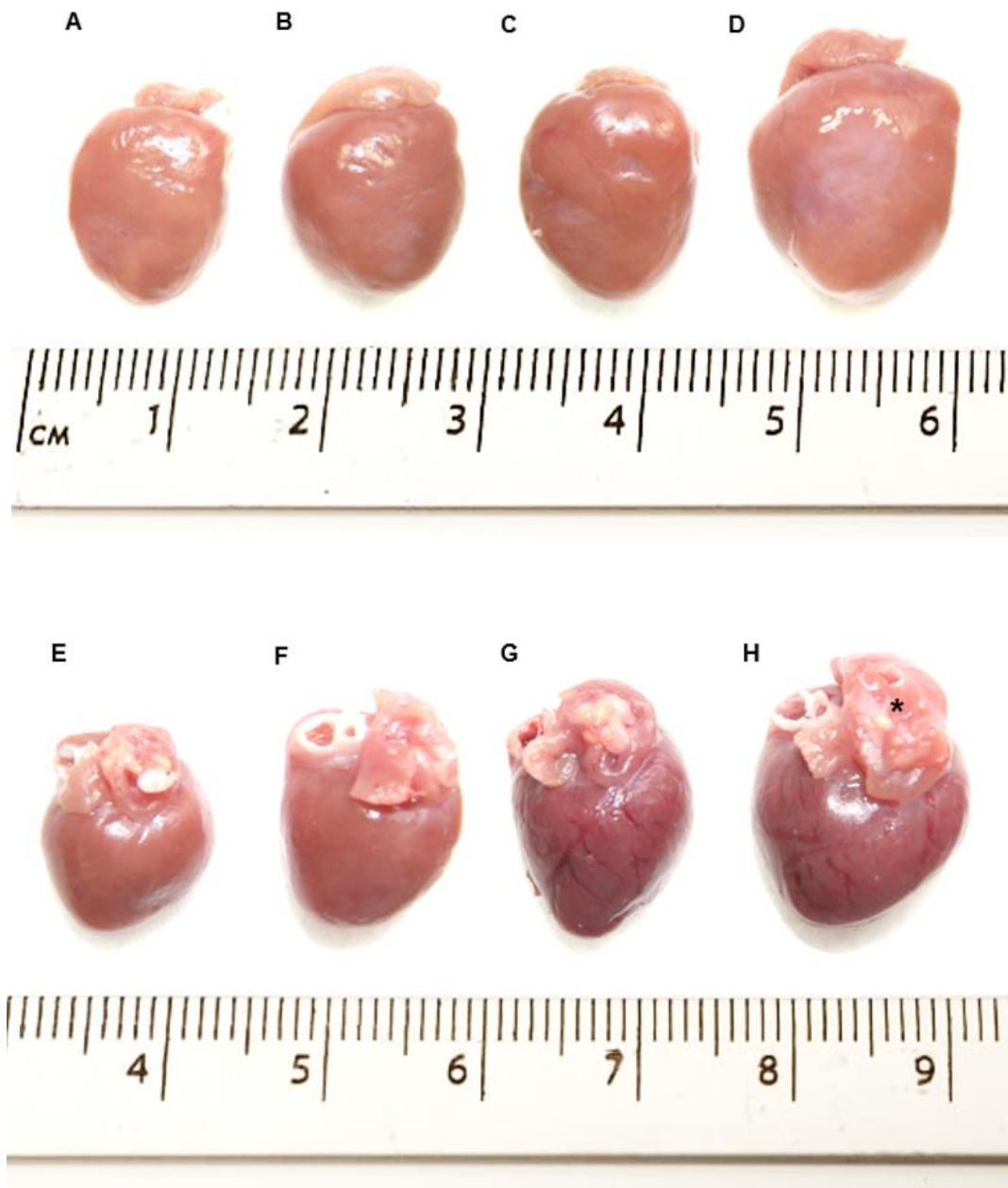


**Fig. 11. Representación gráfica de características generales y cardiacas (1).** Peso del corazón (g) en grafica superior izquierda, diferencias significativas entre CTRL vs CTRL + HVD, CTRL + HVD vs CARD  $**P \leq 0.01$ , MCT vs CARD y CTRL vs CARD  $***P \leq 0.001$ . Peso del VD (mg) en grafica superior derecha, diferencias significativas entre todos los grupos  $***P \leq 0.001$  y entre CTRL vs MCT  $*P \leq 0.05$ . Relación ventrículo derecho/ peso corporal (VD/PC) en grafica inferior izquierda, significancia entre todos los grupos  $***P \leq 0.001$ , MCT vs CTRL y MCT vs CTRL + HVD  $**P \leq 0.01$ . Índice ventrículo derecho/ ventrículo izquierdo + septum interventricular VD/(VI + SIV) en la gráfica inferior derecha con significancia entre los grupos: CTRL vs CTRL + HVD, CTRL vs CARD, MCT vs CARD y CTRL + HVD vs CARD  $***P \leq 0.001$ . Se realizó una prueba ANOVA de una vía con un test post-hoc Bonferroni. ns  $P > 0.05$ ,  $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.01$ ,  $***P \leq 0.001$ .

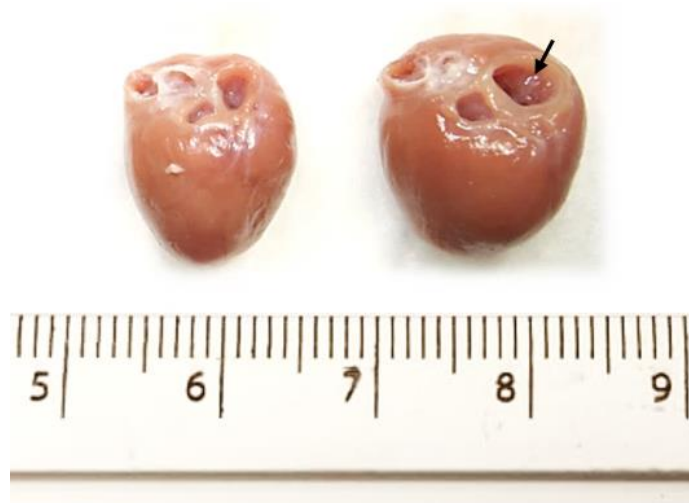


**Fig. 12. Representación gráfica de características generales y cardiacas (2).** Grosor del VD (mm) en grafica superior izquierda con diferencias significativas en todos los grupos  $***P \leq 0.001$  a excepción de los señalados (ns). Peso del VI (mg) grafica superior derecha, con diferencias significativas entre CTRL vs CARD y MCT vs CARD  $*P \leq 0.05$ , y entre CTRL vs CTRL + HVD y MCT vs CTRL + HVD  $**P \leq 0.01$ . Peso pulmonar (g) en grafica inferior izquierda (ns). Índice peso pulmonar g/peso corporal (PC) (g) gráfica inferior derecha con diferencias significativas entre CTRL vs MCT, MCT vs CTRL + HVD, CTRL + HDV vs CARD  $**P \leq 0.01$  y CTRL vs CARD  $*P \leq 0.05$ . Se realizó una prueba ANOVA de una vía con un test post-hoc Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ).

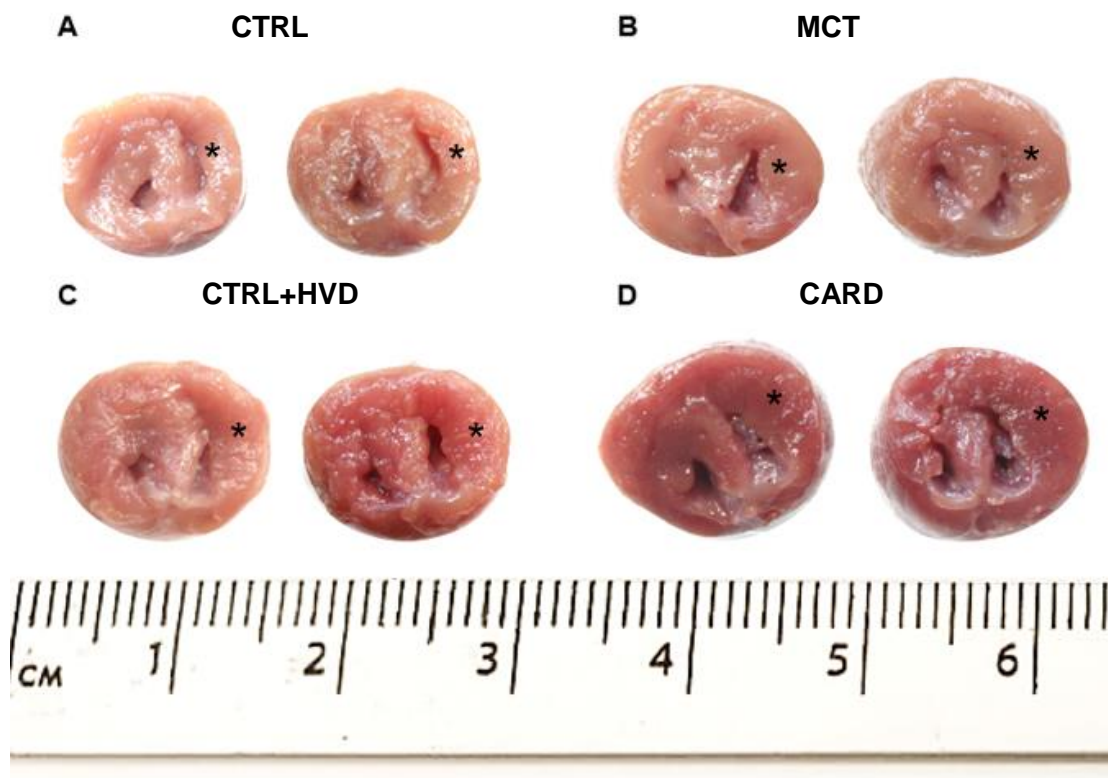
### 9.3 Análisis cualitativo macroscópico



**Fig. 13. Remodelación estructural e incremento macroscópico en las dimensiones cardíacas.** Representación macroscópica del incremento en el tamaño de corazones en vista anterior (A-D) y posterior (E-H) de los grupos CTRL (A, E), MCT (B, F), CTRL + HVD (C, G) y CARD (D, H). Las líneas verticales debajo de cada imagen indican la escala en milímetros (mm). Nótese el incremento recíproco en el tamaño auricular (\*).

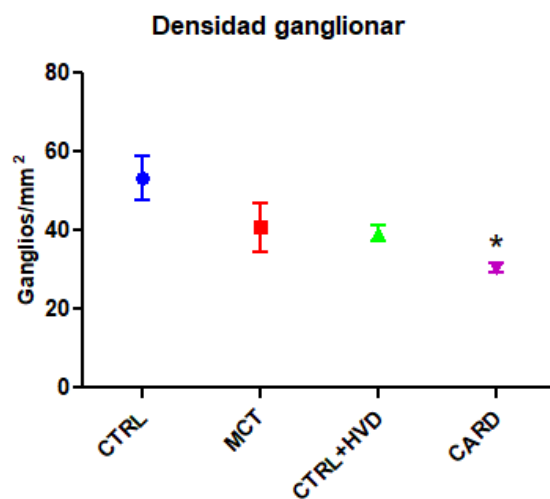


**Fig. 14. Dilatación del tracto de entrada ventricular derecho (TEVD).** Representación en vista posterior cardiaca de un corazón CTRL (izquierda) vs CARD (derecha). La flecha (↙) indica la presencia de dilatación severa en la región del seno o tracto de entrada del ventrículo derecho (TEVD) presente en el grupo de corazones compatibles con cardiomegalia.

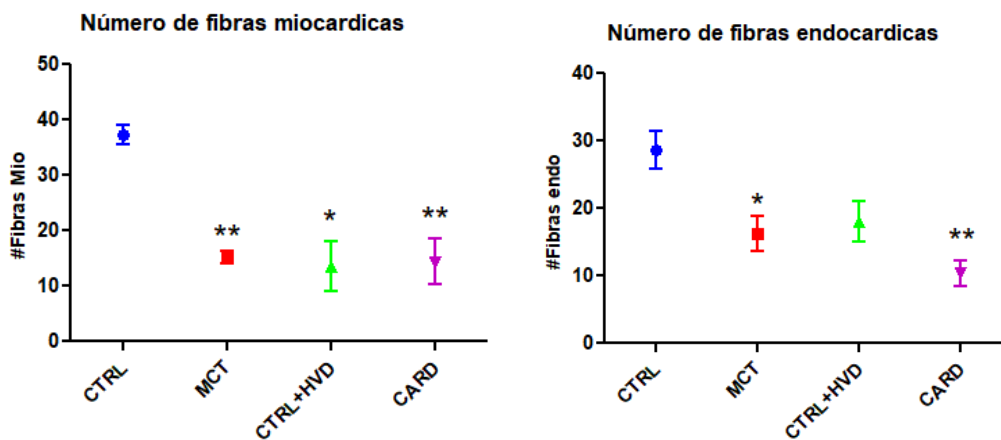


**Fig. 15. Representación macroscópica del grosor de cavidades en corte transversal desde una vista superior.** CTRL (A), MCT (B), CTRL + HVD (C) y CARD (D). Los asteriscos (\*) indican la ubicación del VD posicionado a la derecha de cada corte seguido por el septum interventricular (SIV) y ventrículo izquierdo (VI). Se muestra el VD visiblemente engrosado de forma gradual CTRL → MCT = CTRL + HVD → CARD, además de la clara dilatación de la cavidad ventricular.

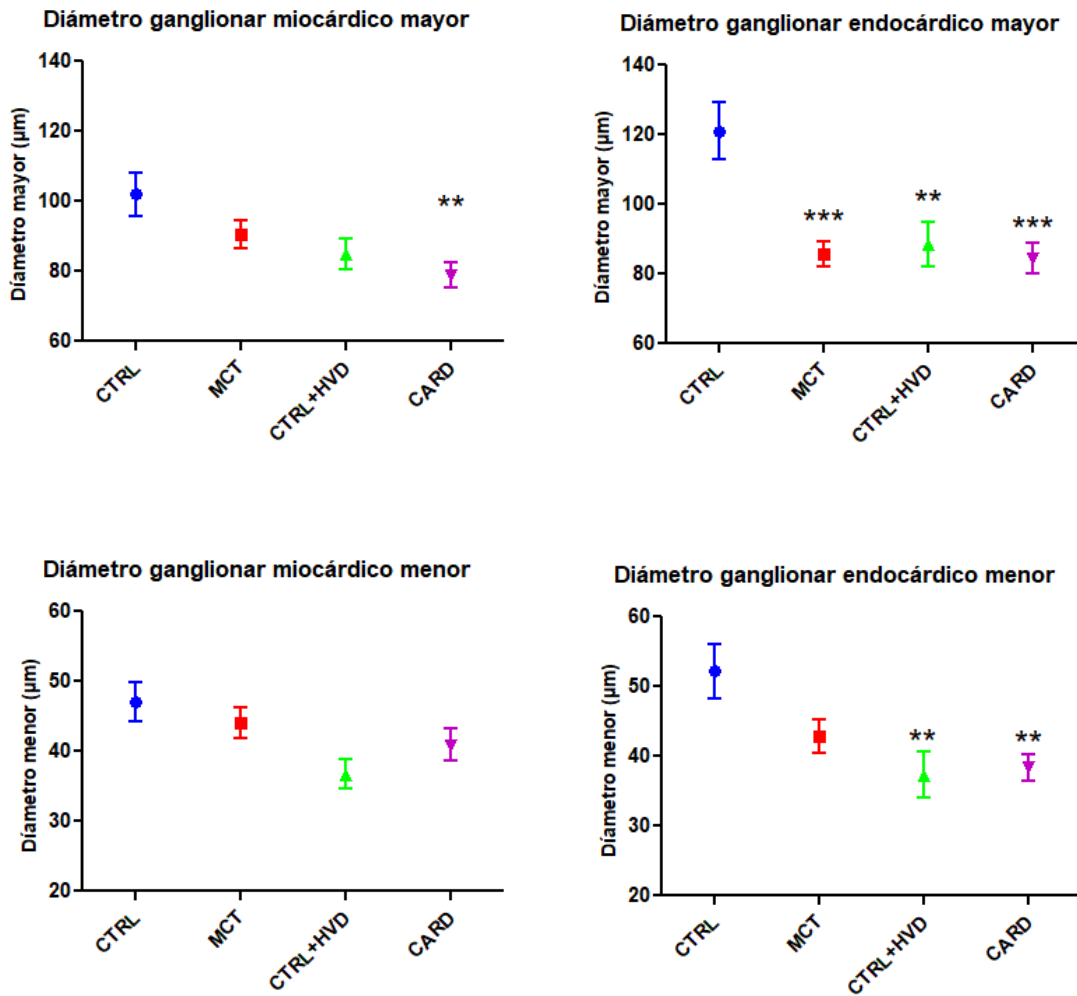
## 9.4 Análisis morfométrico de laminillas por el método Golgi-Cox



**Fig. 16. Análisis morfométrico de densidad ganglionar miocárdica.** Densidad ganglionar en miocardio por microscopía óptica 4X. Los ganglios se analizaron en relación al número de ganglios por unidad de área (mm<sup>2</sup>). Se realizó una prueba ANOVA de una vía con prueba post-hoc Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ). \*  $P \leq 0.05$  CTRL vs CARD.  $n = 4$  en cada grupo.



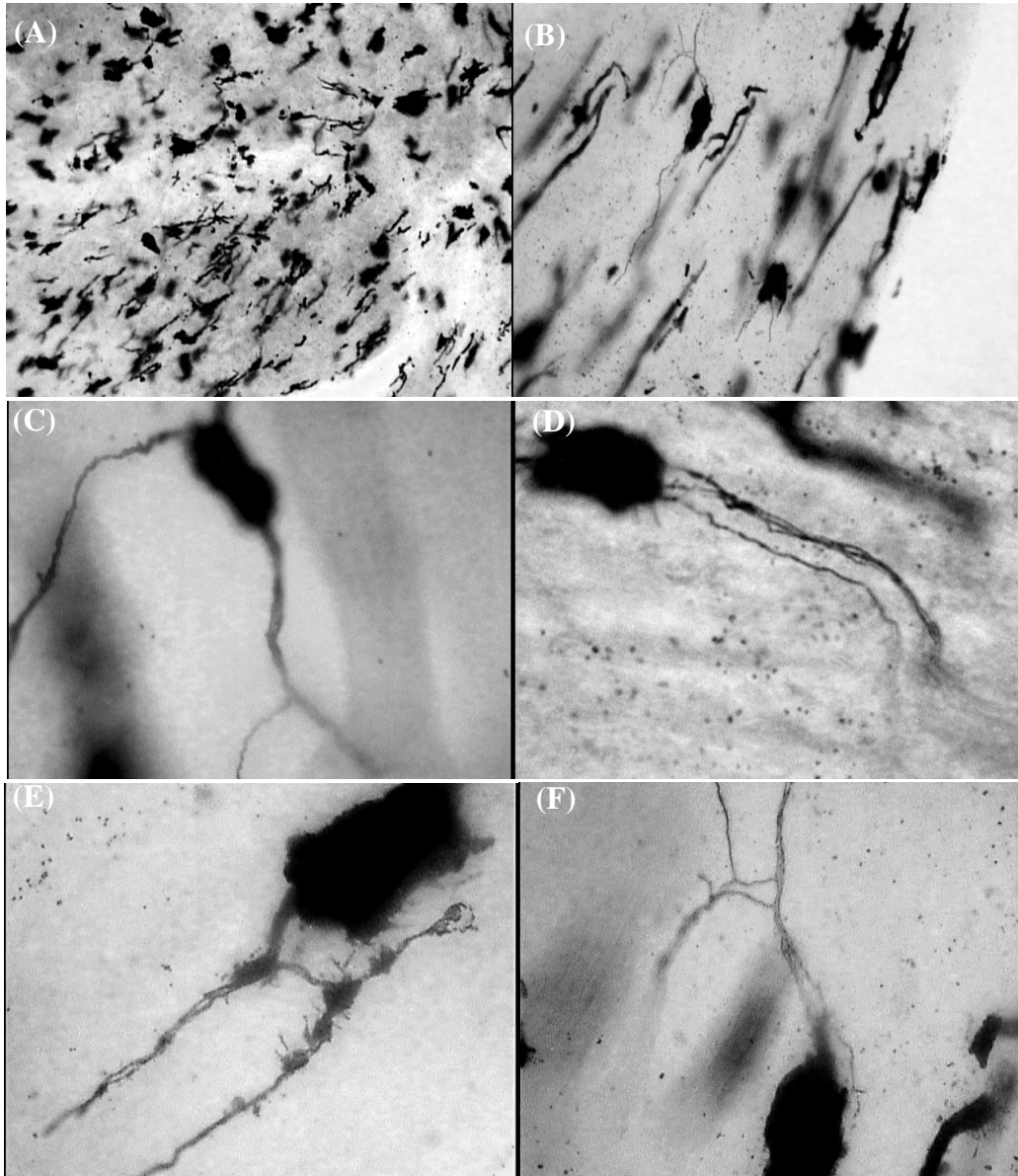
**Fig. 17 Análisis morfométrico del número de fibras en miocardio y endocardio.** Número de fibras en miocardio (Izquierda) con diferencias significativas entre CTRL vs MCT, CTRL vs CARD \*\* $P \leq 0.01$  y CTRL vs CTRL + HVD \* $P \leq 0.05$ , y endocardio (derecha) con diferencias significativas entre CTRL vs MCT y CTRL vs CARD. Las fibras se analizaron por conteo en cada ganglio de cada grupo. Se realizó una prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ).  $n = 4$  en cada grupo.



**Fig. 18. Diámetro ganglionar miocárdico-endocárdico mayor y menor** Determinación del diámetro ganglionar por microscopía óptica en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) en el eje longitudinal mayor (gráficos superiores) y menor (gráficos inferiores). Diámetro transversal menor de miocardio (izquierda) y endocardio (derecha). Se realizó una prueba ANOVA de una vía con una prueba post-hoc Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ). \*Diferencia significativa en diámetro mayor miocárdico CTRL vs CARD  $**P \leq 0.01$  y endocárdico mayor CTRL vs MCT, CTRL vs CARD  $***P \leq 0.001$ , CTRL vs CTRL + HDV  $**P \leq 0.01$ . Diferencias significativas en el diámetro endocárdico menor CTRL vs CTRL + HVD y CTRL vs CARD  $**P \leq 0.01$ . n = 4 en cada grupo.

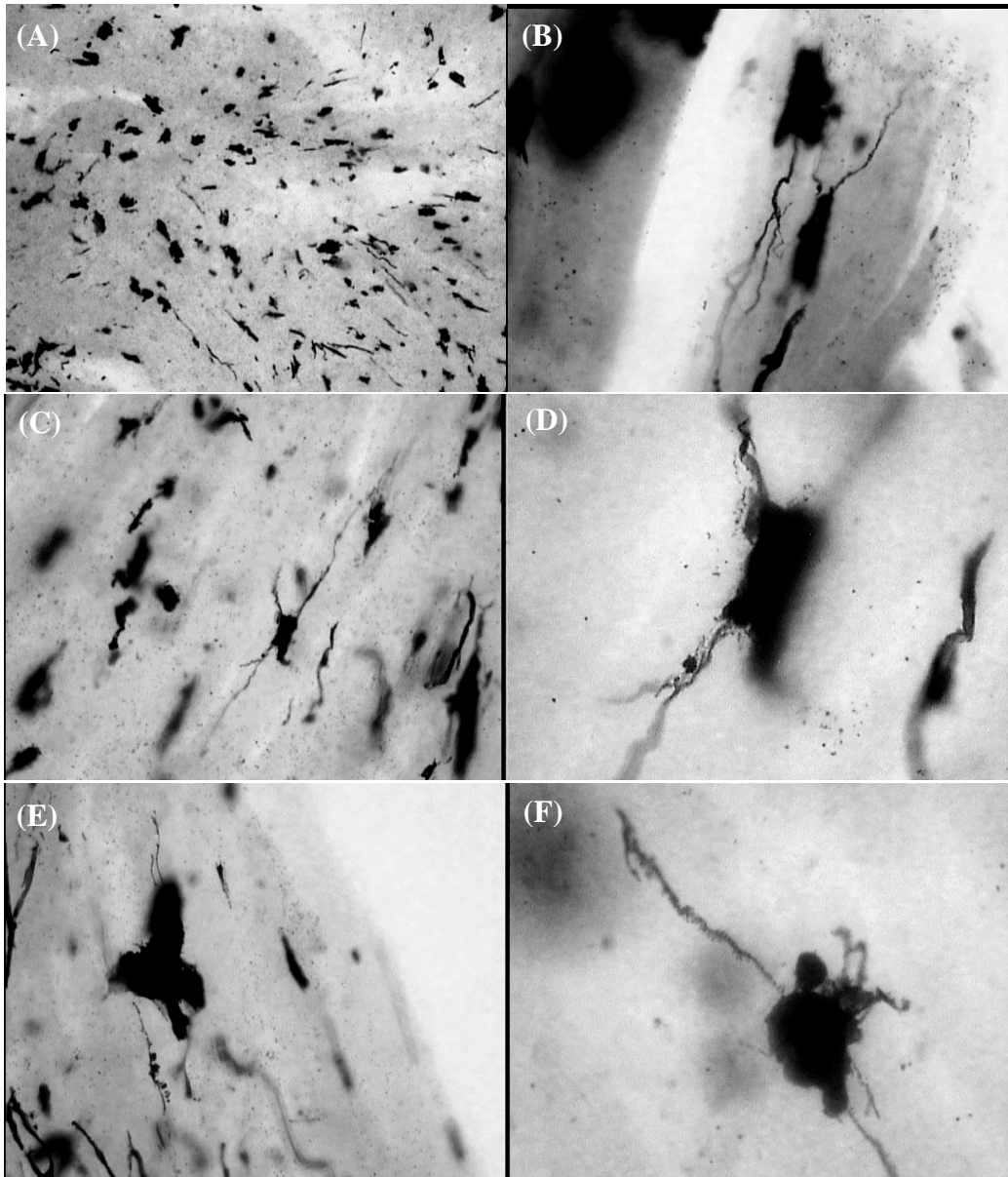
## 9.5 Fotomicrografías por la técnica de Golgi-Cox

Grupo: CTRL



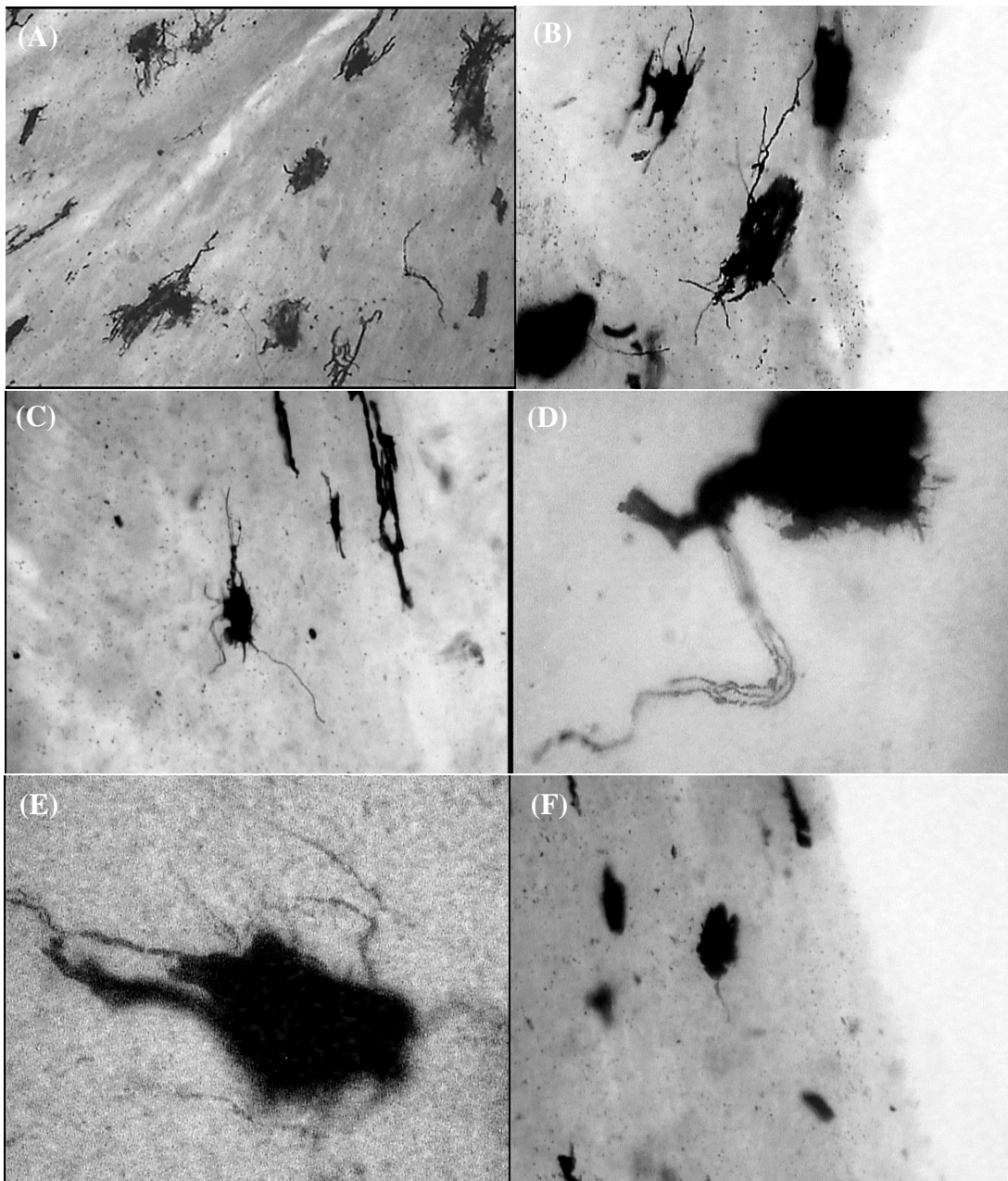
**Fig. 19. Fotomicrografías de tejidos procesados por la técnica de Golgi-Cox del grupo CTRL.** Imagen que muestra la densidad y distribución ganglionar aproximada en la región media del miocardio de VD 4X (A). Fotomicrografía de la distribución y densidad ganglionar aproximada en endocardio de VD 10X (B). Ganglios en miocardio (C), (D) y (E), y en endocardio de VD (F) 40X.

Grupo: MCT



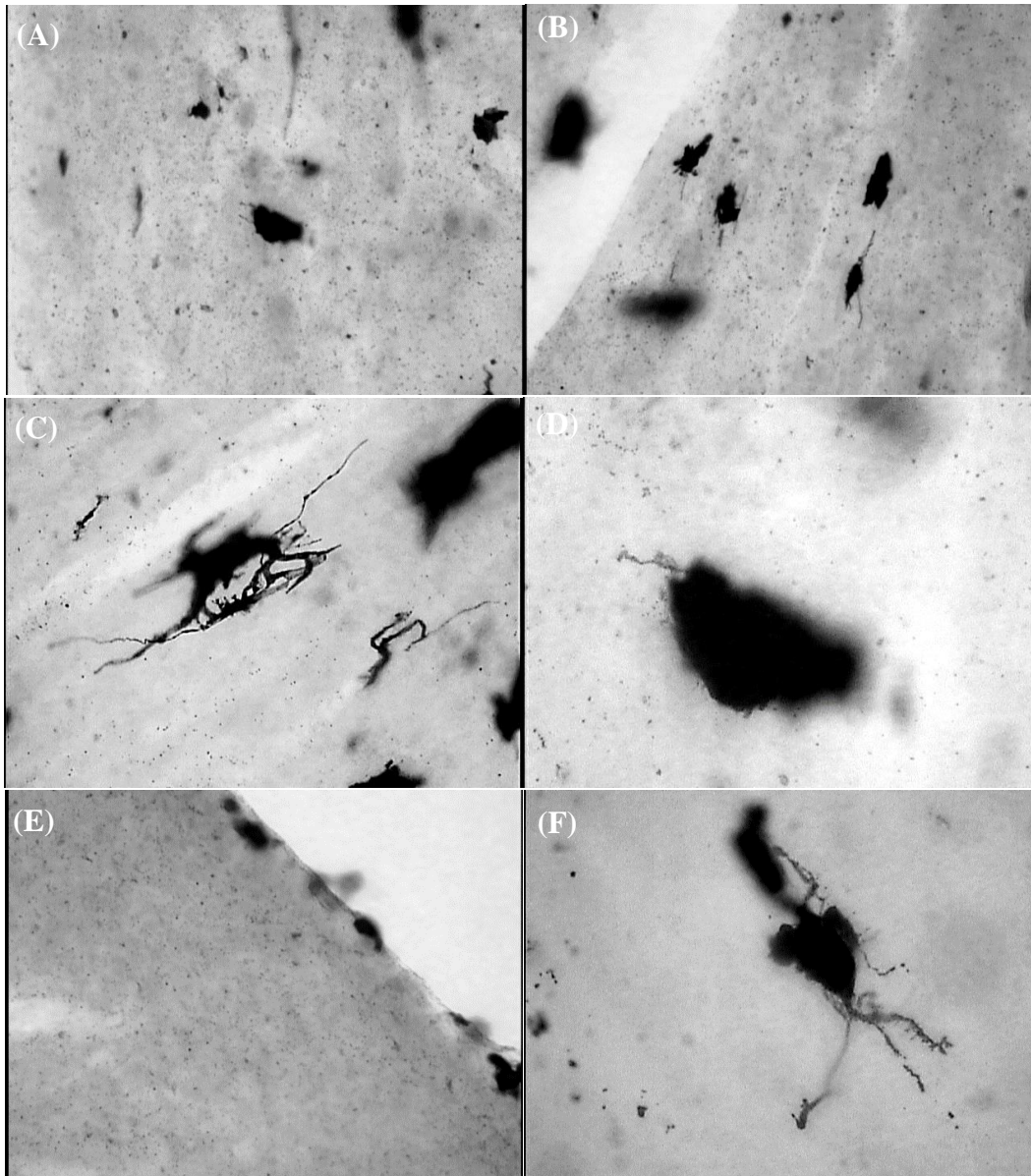
**Fig. 20. Fotomicrografías de tejidos procesados por la técnica de Golgi-Cox del grupo MCT. Imagen que muestra la densidad y distribución ganglionar aproximada en la región media del miocardio de VD 4X (A), 10X (C). Representación de ganglios en el endocardio de VD (B) y (E) y en miocardio (D) y (F) 40X.**

Grupo: CTRL+HVD



**Fig. 21. Fotomicrografías de tejidos procesados por la técnica de Golgi-Cox del grupo CTRL+HVD. Imagen que muestra la densidad y distribución ganglionar aproximada en la región media del miocardio de VD 10X (A) y (C). Distribución ganglionar en endocardio de VD (B) y (F) 10X. Ganglios representativos en miocardio de VD (D) y (E) 40X.**

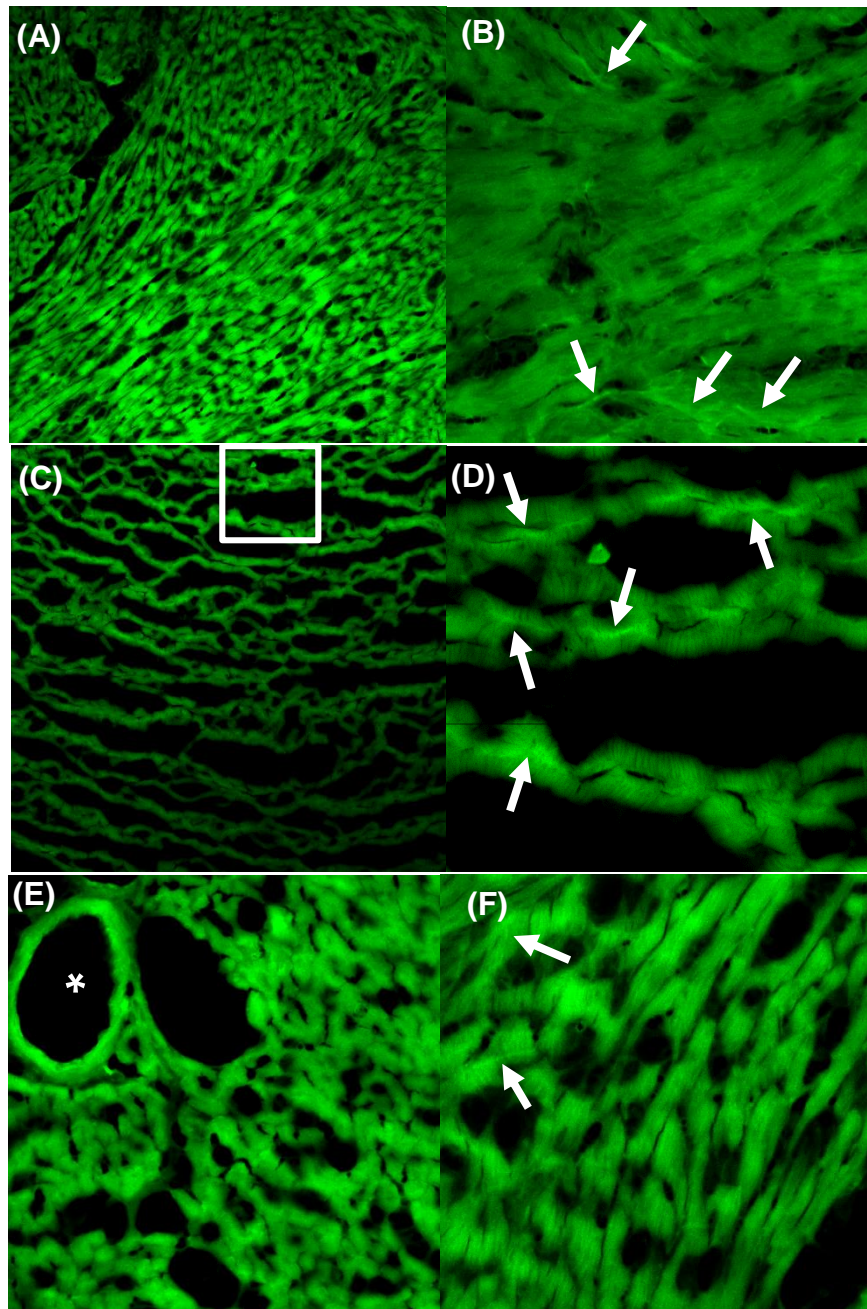
Gupo: CARD



**Fig. 22. Fotomicrografías de tejidos procesados por la técnica de Golgi-Cox del grupo CARD.** Fotomicrografías de distribución y densidad ganglionar aproximada de la región media del miocardio de VD (A) 10X, endocardio (B) 10X y subepicardio (E) 10X. Ganglios representativos en endocardio de VD (C) 40X y miocardio (D) y (F) 40X.

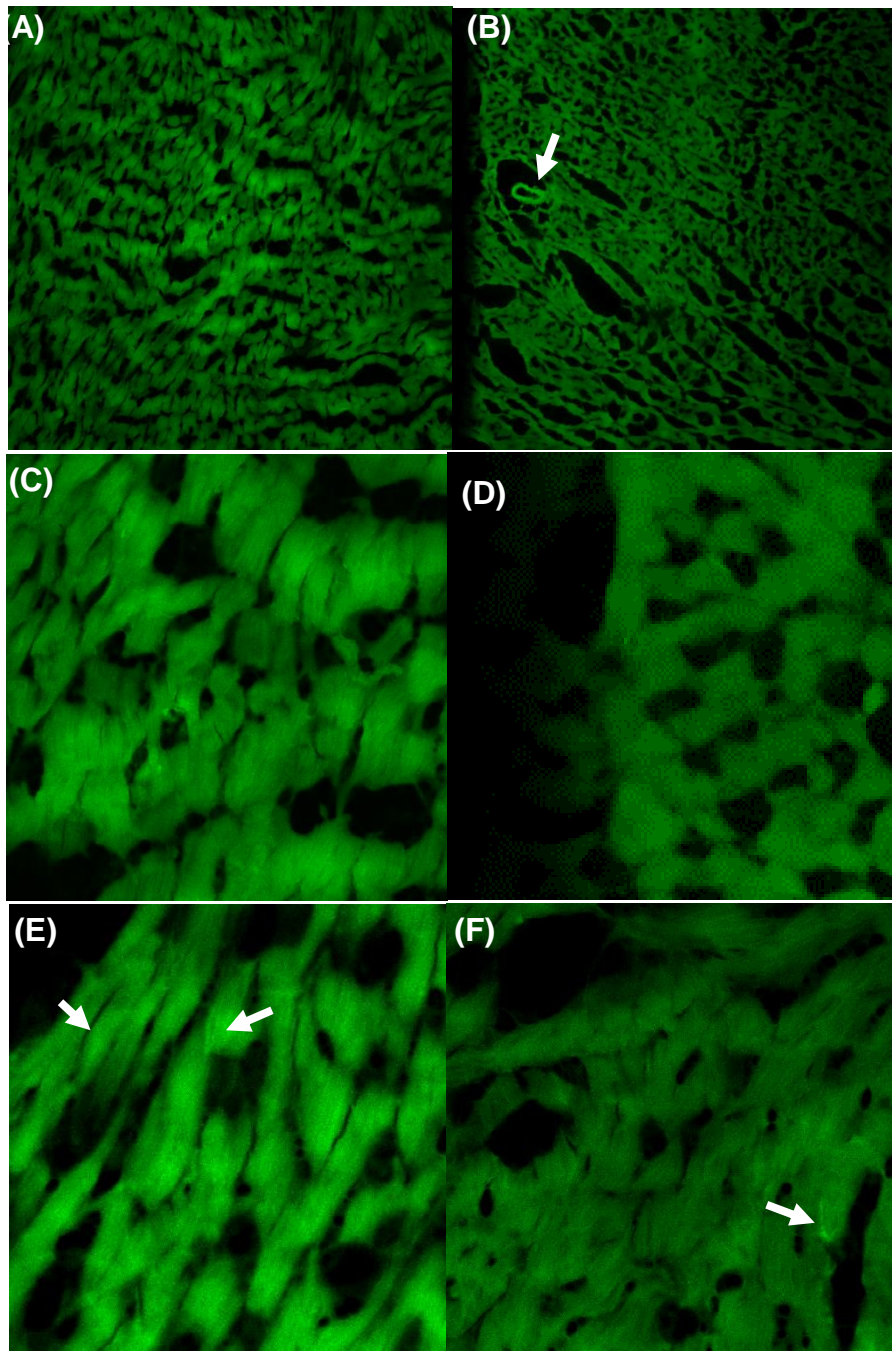
## 9.6 Análisis cualitativo de fluorescencia por la técnica de ácido glioxílico

Grupo: CTRL



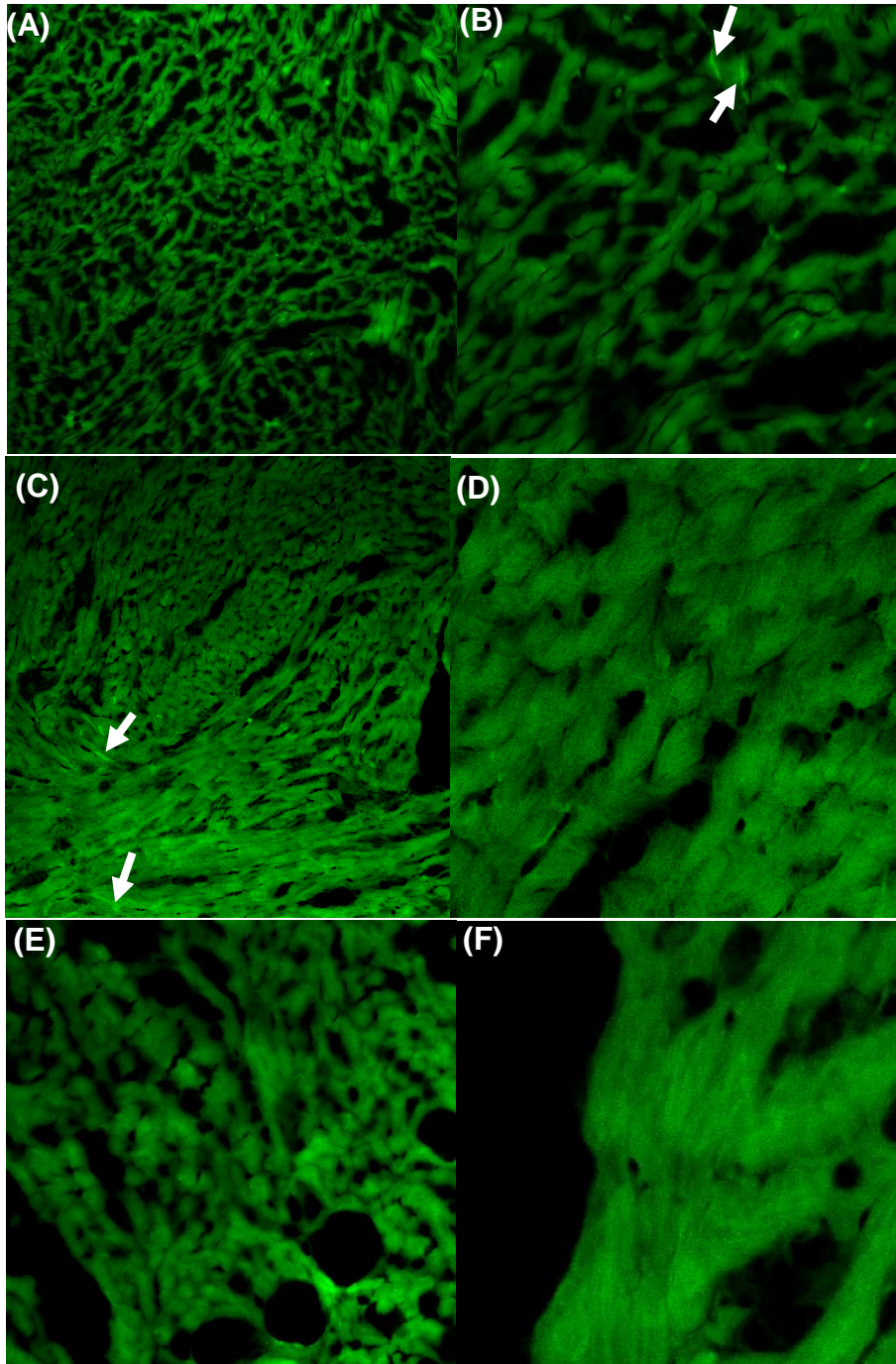
**Fig. 23.** Fotomicrografías de microscopía de fluorescencia de tejidos procesados por la técnica de ácido glioxílico grupo CTRL. Miocardio de VD zona media 4X (A), Miocardio zona media 10X (B), miocardio zona basal 4X (C) y Zoom (D). Endocardio zona basal (E) y zona media (F), 10X. Las flechas indican la presencia de fibras simpáticas positivas para el marcaje de catecolaminas. El asterisco (\*) indica el marcaje de un vaso sanguíneo.

Grupo: MCT



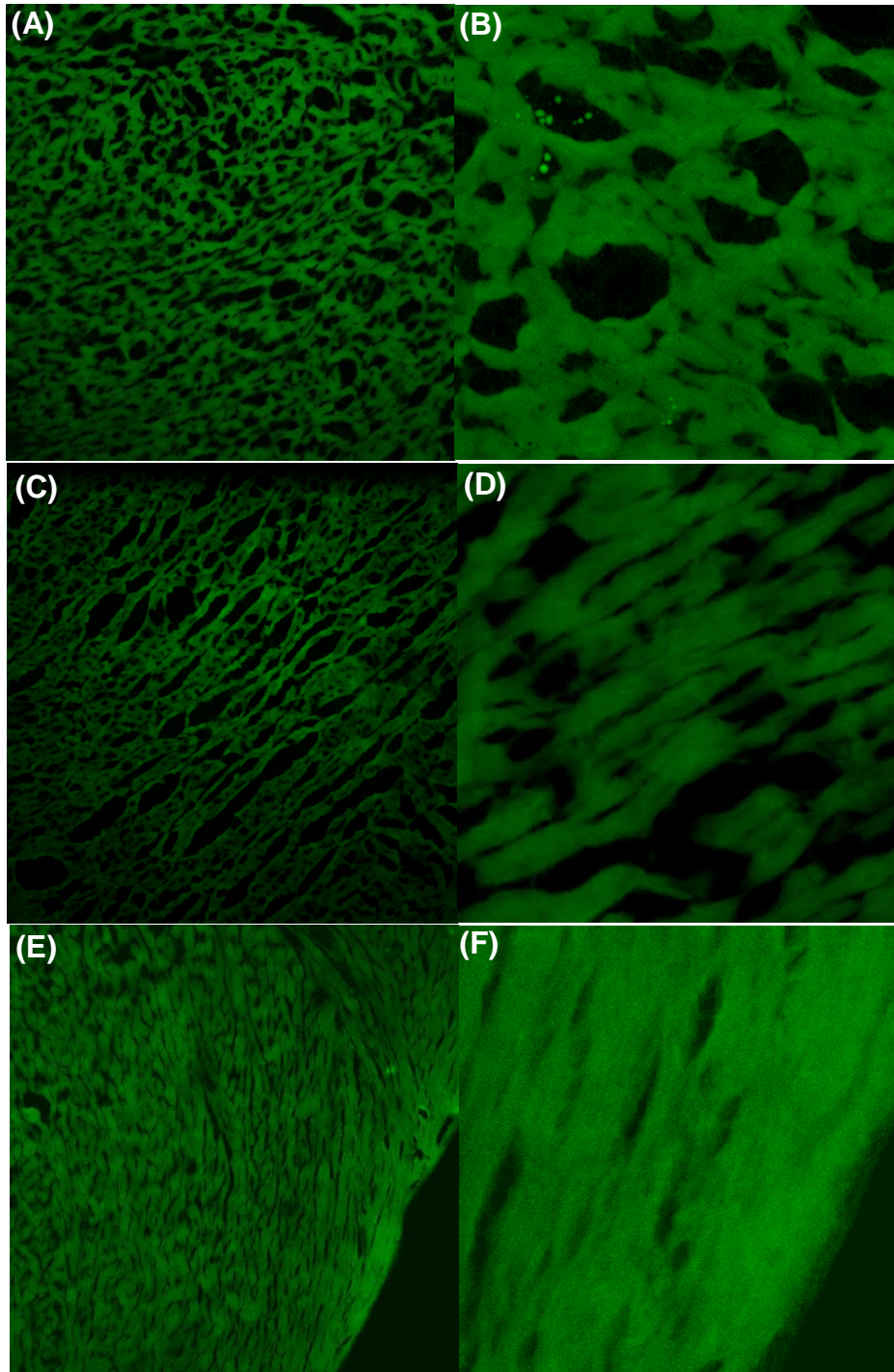
**Fig. 24. Fotomicrografías de microscopía de fluorescencia de tejidos procesados por la técnica de ácido glioxílico grupo MCT.** Miocardio del VD zona basal 4X (A), Miocardio zona lateral 10X y vaso sanguíneo (flecha) (B), miocardio zona basal 4X (C), endocardio zona basal (E) y zona apical (F), 4X. Las flechas indican la presencia de fibras simpáticas positivas para el marcaje de catecolaminas. Es notoria la disminución en el marcaje de coloración en verde en comparación al grupo CTRL.

Grupo: CTRL+HVD



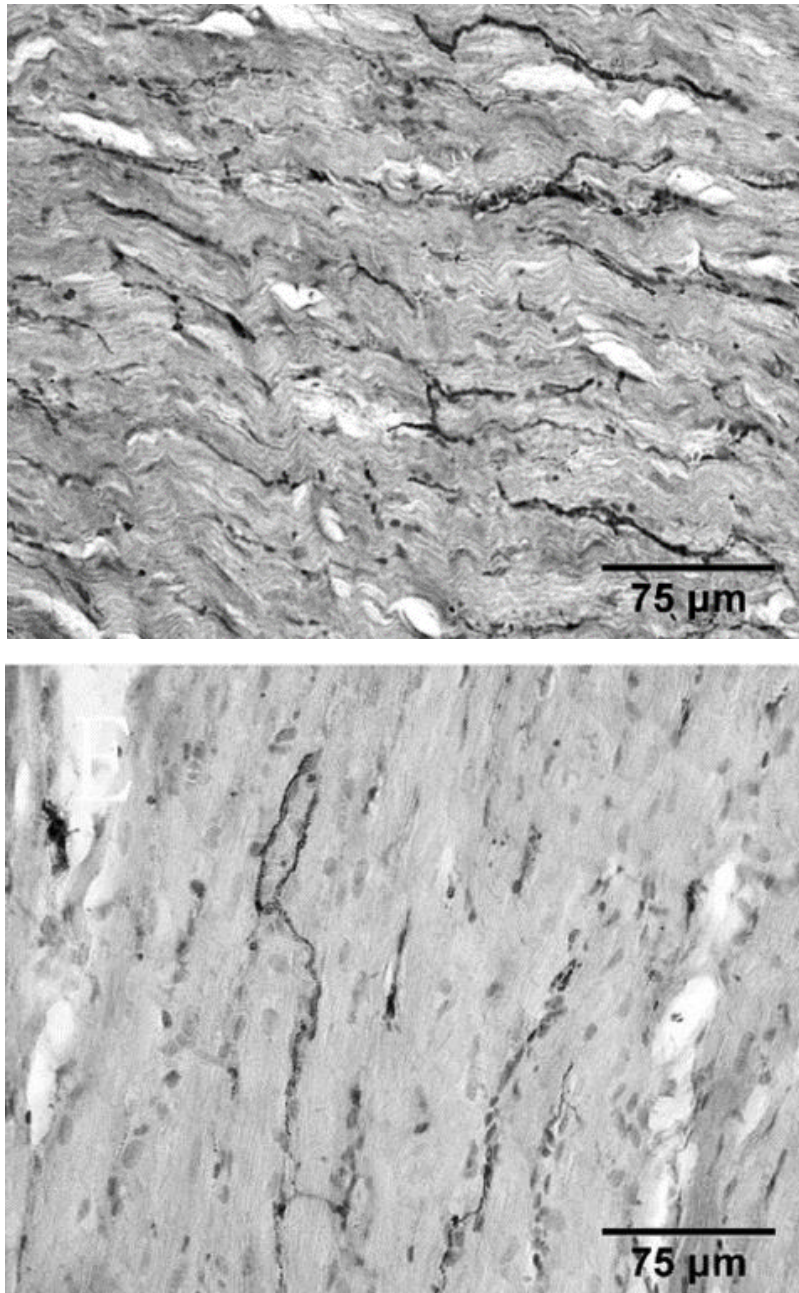
**Fig. 25.** Fotomicrografías de microscopía de fluorescencia de tejidos procesados por la técnica de ácido glioxílico grupo **CTRL+HVDR**. Miocardio del VD zona lateral 4X (A), Miocardio zona media 10X (B), miocardio zona basal 4X (C), endocardio zona basal (D), zona apical (E), y zona lateral (F) 10X. Las flechas indican la presencia de fibras simpáticas positivas para el marcaje de catecolaminas. El marcaje es evidentemente mayor con respecto al grupo MCT, pero menor en relación con el grupo CTRL.

Grupo: CARD



**Fig. 26. Fotomicrografías de microscopía de fluorescencia de tejidos procesados por la técnica de ácido glioxílico grupo CARD.** Miocardio de VD zona basal 4X (A), y 10X (B), miocardio zona media 4X (C), endocardio zona basal (D), zona medio-apical 4X (E), y 10X (F). No se encontraron similitudes en el análisis de fibras simpáticas con respecto al resto de los grupos. El marcaje en fibras y en coloración es evidentemente menor con respecto al grupo MCT, CTRL y CTRL + HVD.

## 9.7 Tinción de acetilcolinesterasa por el método de Karnovsky



**Fig. 27. Imágenes representativas de la técnica de AchE en tejido cardiaco.** Imágenes representativas que muestran una vista similar a la impregnación que se produce en tejido cardiaco por la técnica de acetilcolinesterasa utilizada para este protocolo. Las fotomicrografías muestran tejidos ventriculares procesados por la técnica de Karnovsky modificada. La imagen superior representa un corte del grupo CTRL y la imagen inferior pertenece a un grupo de insuficiencia cardiaca inducida por Adriamicina (Xu et al., 2006). En los resultados de los tejidos de VD no hubo diferencias significativas en la impregnación por análisis cualitativo, sin embargo, debido a la pandemia por el COVID-19, no fue posible tener acceso a dichas fotomicrografías para demostrarlo.

## 9.8 Cuantificación de acetilcolinesterasa por el método de Ellman

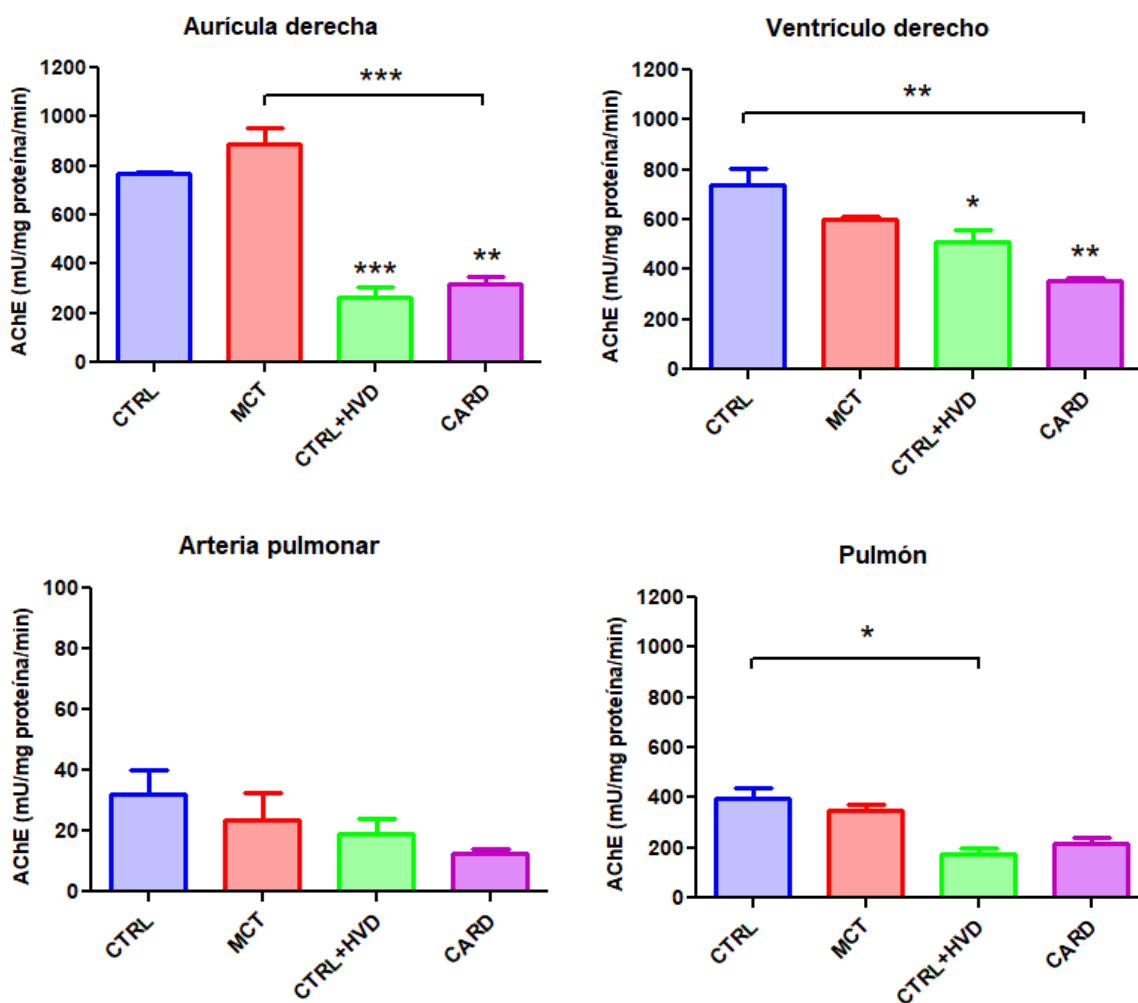


Fig. 27. Cuantificación de AChE por el método de Ellman 1. Análisis de acetilcolinesterasa en homogenados de tejido en los grupos CTRL, MCT, CTRL + HVD y CARD. Se realizó una prueba ANOVA de una vía con una prueba post-hoc Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ). **Aurícula Derecha:** Se encontraron diferencias significativas entre CTRL vs CTRL + HVD y CTRL vs CARD  $**P \leq 0.01$ . MCT vs CTRL + HVD y MCT vs CARD  $***P \leq 0.001$ . **Ventriculo Derecho:** Diferencias significativas en CTRL vs CARD y MCT vs CARD  $**P \leq 0.01$ . CTRL vs CTRL + HVD  $*P \leq 0.05$ . **Pulmón:** CTRL vs CTRL + HVD  $*P \leq 0.05$ . No hubo diferencias significativas en la cuantificación de arteria pulmonar.

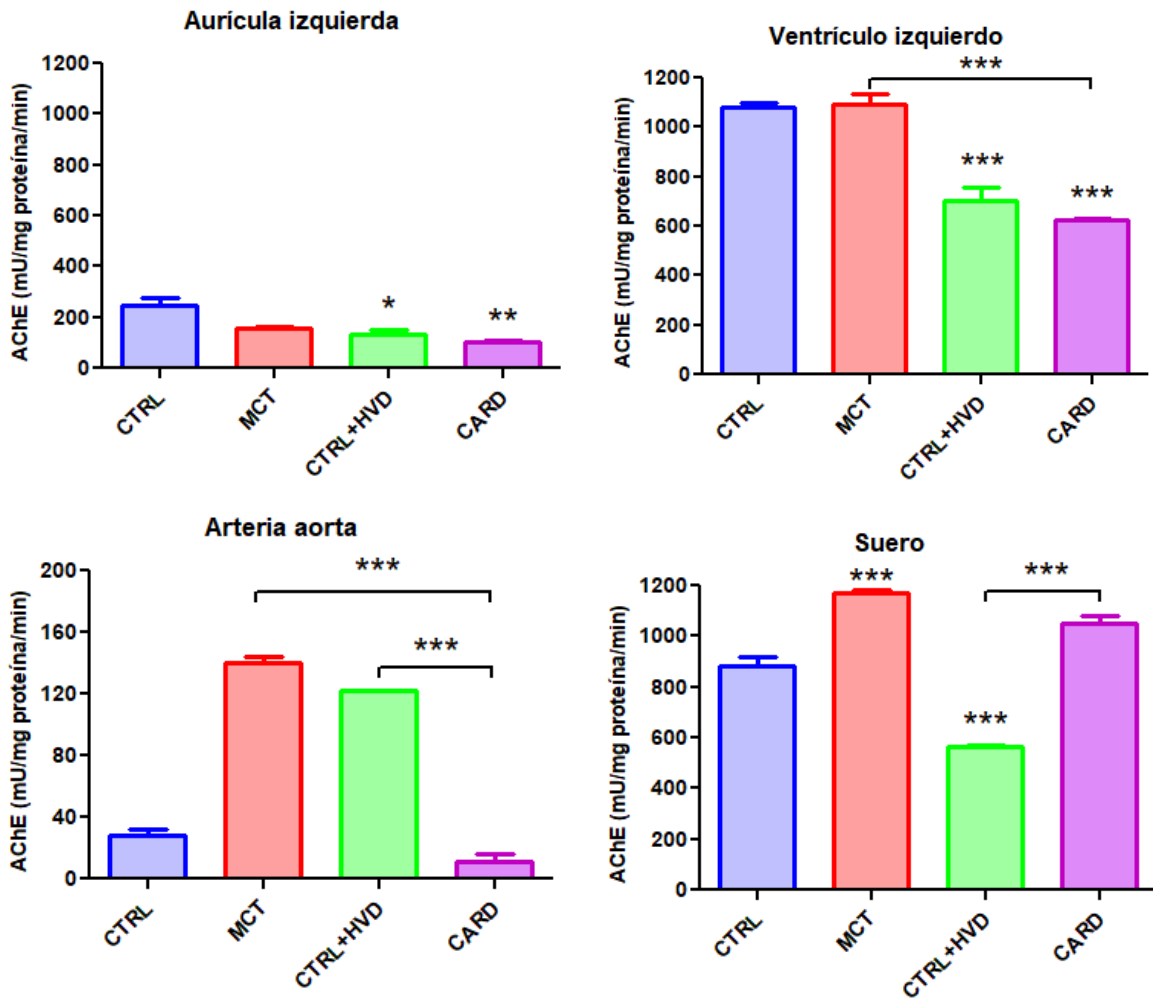


Fig. 28. Cuantificación de AChE por el método de Ellman 2. Análisis de acetilcolinesterasa en homogenados de tejido en los grupos CTRL, MCT, CTRL + HVD y CARD. Se realizó una prueba ANOVA de una vía con una prueba post-hoc Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ). **Aurícula Izquierda:** CTRL vs CTRL + HVD  $* P \leq 0.05$  y CTRL vs CARD  $**P \leq 0.01$ . **Ventriculo Izquierdo:** Valores significativos en la mayoría de los grupos, CTRL vs CTRL + HVD, CTRL vs CARD, MCT vs CTRL + HVD y MCT vs CARD  $***P \leq 0.001$ . **Arteria Aorta:** Diferencias significativas entre CTRL vs MCT, CTRL vs CTRL + HVD, MCT vs CARD y CTRL + HVD vs CARD  $***P \leq 0.001$ . \*En cuanto a la cuantificación en suero, se encontraron diferencias significativas en todas las comparaciones entre grupos  $***P \leq 0.001$ .

## 9.9 Cuantificación de NO<sub>2</sub> por la reacción de Griess

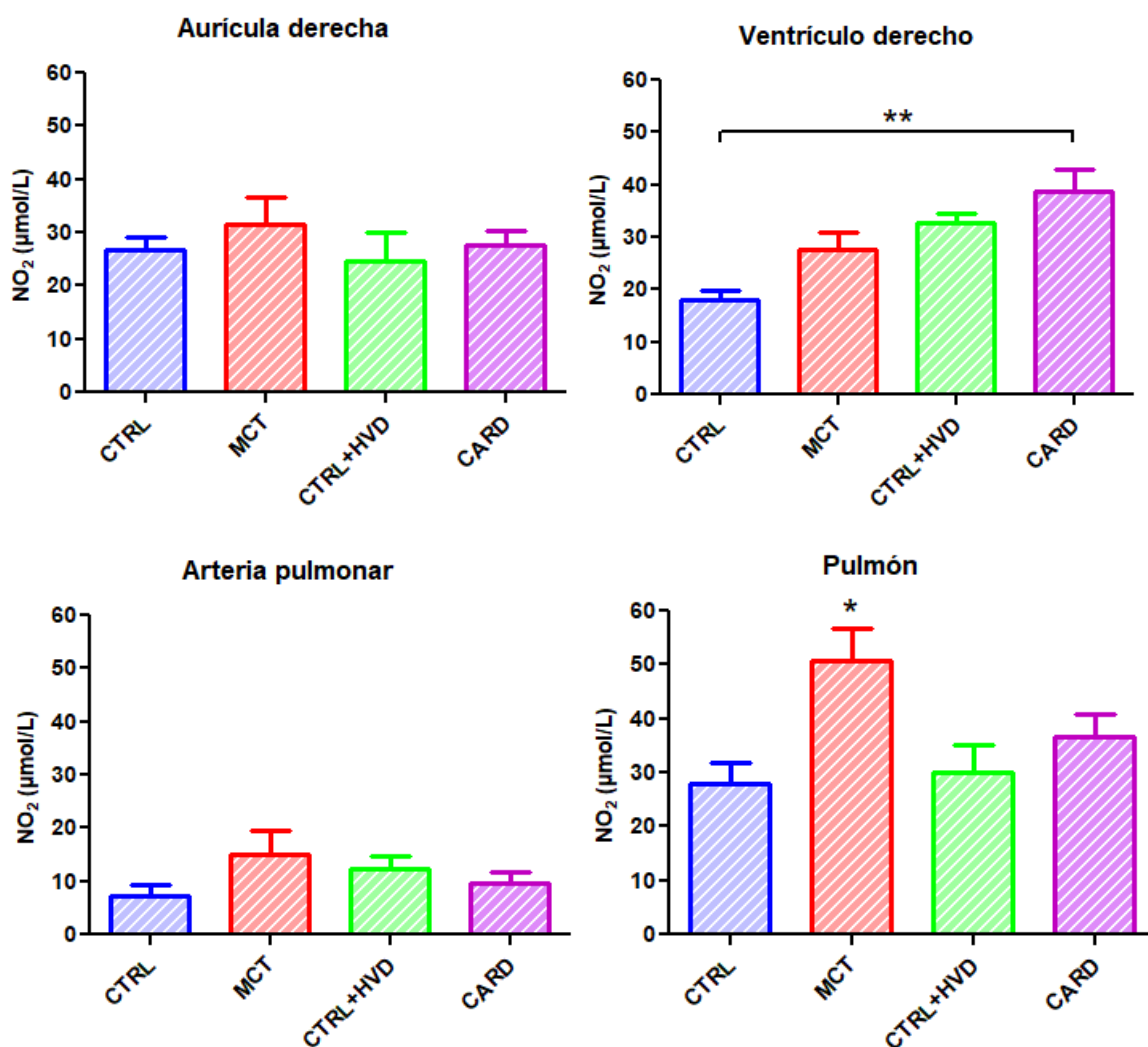


Fig. 29. Cuantificación de nitritos (NO<sub>2</sub>) por la reacción de Griess I. Análisis nitritos en homogenados de diferentes tejidos en los grupos CTRL, MCT, CTRL + HVD y CARD. Se realizó una prueba ANOVA de una vía con una prueba post-hoc Bonferroni  $P \leq 0.05$ . Se encontraron diferencias significativas en **VD**: CTRL vs CARD  $**P \leq 0.01$  y **Pulmón**: entre los grupos CTRL vs MCT  $*P \leq 0.05$ .

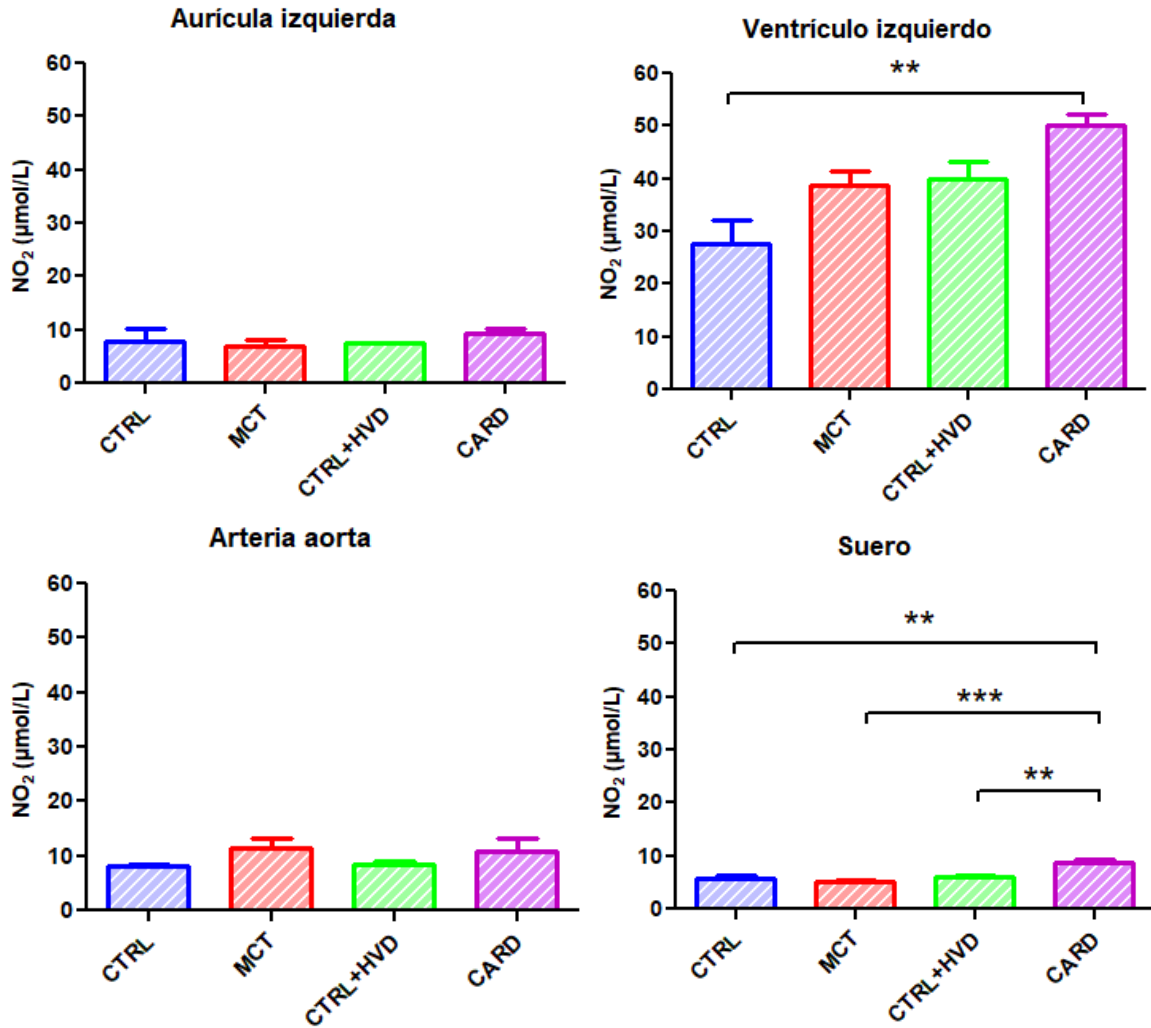
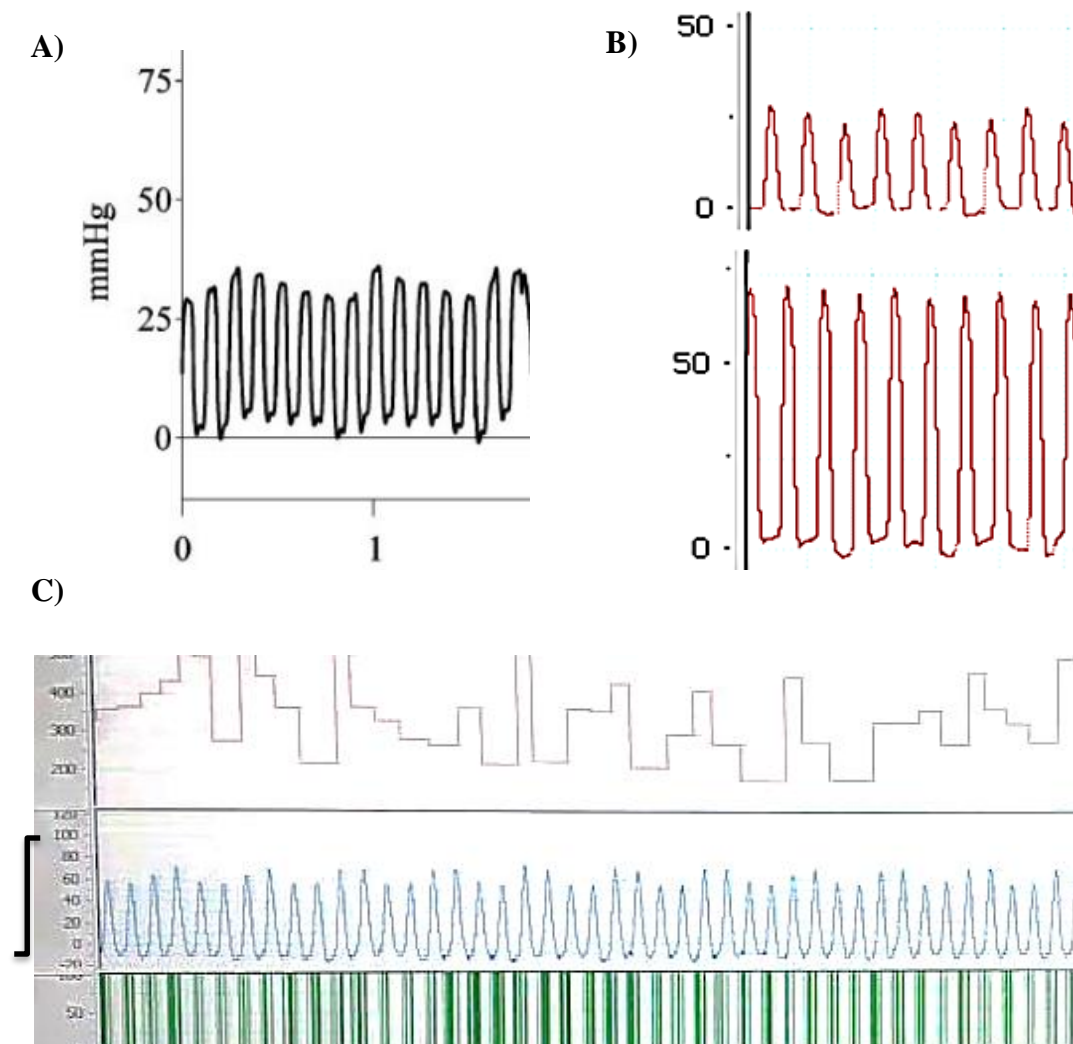


Fig. 30. Cuantificación de nitritos (NO<sub>2</sub>) por la reacción de Griess 2. Análisis nitritos en homogenados de diferentes tejidos en los grupos CTRL, MCT, CTRL + HVD y CARD. Se realizó una prueba ANOVA de una vía con una prueba post-hoc Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ). Se encontraron diferencias significativas en ventrículo izquierdo entre los grupos CTRL vs CARD  $**P \leq 0.01$ . También se encontró diferencia en suero entre los grupos CTRL vs CARD  $**P \leq 0.01$  y MCT vs CARD  $***P \leq 0.001$ .

## 9.10 Presión intraventricular derecha



**Fig. 31. Registro de presión intraventricular derecha.** Imagen representativa de un registro típico de presión intraventricular derecha en rata con valores normales (25mmHg) (A) (Deten, Millar y Zimmer, 2003). Imagen representativa de un registro control con 25mmHg (superior) en comparación con un registro problema con 60mmHg (inferior) en ratas administradas con MCT (B) (Yin et al., 2017). Registro de presión intraventricular derecha para el protocolo actual en rata Wistar Kyoto macho con HP que evidencia el incremento en la presión del ventrículo derecho con un promedio aproximado de 60mmHg (C). \*El registro CTRL de presión intraventricular derecha fue representado solo como un ejemplo de otros reportes que han desarrollado la técnica, ya que no fue posible tener acceso a los registros recabados para este protocolo debido a la pandemia del COVID-19.

## 10. Discusión

La hipertrofia cardiaca representa una respuesta adaptativa o compensatoria en situaciones de sobrecarga de presión, que a su vez puede evolucionar a insuficiencia cardiaca. Los mecanismos fisiopatológicos de este cambio repentino con un enfoque al ventrículo derecho aún no son bien conocidos, aunque un gran número de investigaciones han demostrado que la inervación puede estar jugando un papel muy importante en el proceso. El modelo utilizado en el presente estudio tiene varias ventajas en la investigación cardiovascular como los son: 1. La hipertensión pulmonar puede desarrollarse en los modelos a través de una única inyección de MCT y esta puede ajustarse a la edad y el peso de los modelos de experimentación

2. La hipertrofia e IC se desarrollarán inicial y predominantemente en el VD lo que supone una ventaja a la hora de enfocar un estudio a esa cavidad.

3. Las modificaciones estructurales y funcionales del VD se desarrollarán de forma indirecta, por lo que no existen reportes de que el fármaco esté afectando directamente el tejido ventricular y pueda producir daño celular o modificaciones que alteren los resultados, sino que lo hace de manera indirecta a través del aumento en la presión arterial pulmonar.

Este estudio estuvo enfocado en caracterizar las alteraciones de la inervación intrínseca en el ventrículo derecho en la hipertrofia y en la insuficiencia cardiaca mediante la administración de MCT a cada uno de los grupos con su respectivo control, por lo que esta fue otra ventaja que nos facilitó el análisis y evaluación de los cambios y remodelación del SIIC de forma gradual conforme evoluciona el proceso fisiopatológico hacia el fallo cardiaco.

La presencia de hipertrofia e insuficiencia cardiaca se confirmó con parámetros como la pérdida progresiva de peso corporal, incremento en el peso del corazón, peso pulmonar (Hessel et al., 2006; Yamada et al., 1991), además de las alteraciones específicas de mayor interés a nivel ventricular derecho como el peso, grosor, incremento en la presión intraventricular, presencia de hipertrofia y de dilatación que se correlacionan con resultados previamente reportados por diversas investigaciones (Hardziyenka et al., 2011; Ishikawa, Berson y Pipberger, 1971; Hessel et al., 2006; Yamada et al., 1991). Interesantemente, se encontró un incremento sucesivo en el tamaño y peso auricular derecho, siendo este uno de los indicadores típicos de disfunción ventricular derecha (Gaynor et al., 2005), en cambio,

para el VI los pesos se mantuvieron relativamente constantes y fue hasta la última etapa en el grupo con cardiomegalia que las modificaciones en el grosor del VI empezaron a ser visibles, lo que podría significar que las afectaciones al VD durante la presencia de cardiomegalia, podrían estar alterando la morfología y función ventricular izquierda generando hipertrofia y en algún momento también tener la posibilidad de culminar en IC por mecanismos de interdependencia ventricular (Naeije y Badagliacca, 2017).

De acuerdo con el análisis cuantitativo de la técnica de Golgi Cox, no hubo una disminución significativa en la densidad de ganglios por  $\text{mm}^2$  si no hasta la etapa más severa de daño cardíaco (cardiomegalia), sin embargo, en el caso de la cuantificación del número de fibras fue evidente la reducción de fibras en los grupos con alteraciones cardíacas con respecto al control, de igual manera con mayor efecto en el grupo con cardiomegalia. Con base en el análisis del diámetro ganglionar miocárdico mayor y menor, los resultados demuestran que el impacto del estímulo nocivo no tiene repercusión significativa en el diámetro ganglionar mayor a excepción del grupo con cardiomegalia. Por otro lado, en el análisis de diámetros ganglionares endocárdicos, estos reflejan un daño con mayor significancia en los diferentes grupos con respecto al control, lo que podría indicar que el estímulo de sobrecarga de presión en VD impacta con mayor intensidad en el endocardio y subendocardio, a diferencia de otras áreas tal y como fue demostrado por Trujillo, en 2012 y Mühlfeld et al., en 2004. Creemos que esto pudo deberse a que, en condiciones normales, el endocardio ventricular derecho cuenta con un mayor número de músculos papilares y trabeculas musculares proyectadas hacia el interior de la cavidad a diferencia de las otras cámaras cardíacas (Ho y Nihoyannopoulos, 2006) y, por consiguiente, debe contar con un mayor número de superficie endocárdica. Ahora, sabiendo que los plexos ventriculares corren por el epicardio para después penetrar y distribuirse con una configuración endocárdica (Cho et al., 2019), se sabe que también las fibras van disminuyendo su grosor hasta volverse muy delgadas conforme avanza su trayecto (Pauziene et al., 2016), esto podría significar que la naturaleza de la inervación endocárdica del VD podría tener un mayor impacto o ser más susceptible a sufrir daños y alteraciones en condiciones de sobrecarga de presión a diferencia del miocardio.

Muchas investigaciones se han enfocado en utilizar otras técnicas para realizar la caracterización de ganglios intracardiacos a nivel ventricular, aplicando técnicas de

inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para marcadores neuronales como PGP 9.5, sustancia P, nNOS, TH, CHAT, CGRP, proteína S100, VIP, NPY, entre otros (Rysevaite et al., 2011; Pauziene et al., 2016; Brack et al., 2007; Hoover et al., 2009; Parsons et al., 2006; Kwang Ho et al., 2019), sin embargo, estas técnicas tienen la desventaja de ser más sofisticadas y de alto costo. A pesar de ello, ya se ha demostrado la utilidad del método Golgi-Cox en la caracterización de la inervación intrínseca cardíaca en todas las cámaras del corazón (Gómez et al., 2009), donde se explica la posibilidad de analizar ganglios intracardiacos además de caracterización de tipos de fibras. Otro dato que corrobora estos hallazgos fue un estudio previo en el laboratorio de fisiología cardiovascular, donde se desarrolló un estudio basado en la remodelación de la inervación cardíaca en la hipertrofia a la tercera semana después de haber administrado MCT a una dosis de 60mg/kg en ratas Sprague Dawley, y se concluyó que existe una evidente disminución tanto en el número ganglionar como en el diámetro mayor y menor del VD (Trujillo, 2012). Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, es posible que sean varios los mecanismos responsables de la hipoinervación originada como isquemia, estrés mecánico, sobre estimulación adrenérgica (Mühlfeld et al., en 2004) activación del eje RAAS (Tomaselli y Zipes, 2004) y apoptosis (Bing, 1994).

En relación a los estudios histológicos de la inervación simpática ventricular derecha por la técnica de ácido glioxílico, se encontró una disminución en el marcaje de fibras en los grupos con hipertrofia y aún más acentuada en el grupo de cardiomegalia, que nos demuestra las diferentes alteraciones en estas dos condiciones. Dentro de los mecanismos fisiopatológicos que acompañan a la evolución de la IC está ampliamente reportada la excesiva actividad simpática pero disminución en las fibras de la misma naturaleza, además de la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona (Zhang y Anderson, 2014; Rutenberg y Spann, 1973; Hartupee y Mann, 2017; Mühlfeld et al., 2010; Lourenço et al., 2006), que inicialmente podría traducirse como un mecanismo compensatorio, pero posteriormente representa un efecto deletéreo en la progresión de la enfermedad. El hecho de que las modificaciones en la inervación simpática difieran de una condición de hipertrofia en comparación con la IC, hace más evidente que estas alteraciones son dependientes del tiempo en relación a la evolución, sin embargo, además de esta alteración existen diferentes indicadores relacionados con modificaciones simpáticas como lo es la regulación a la baja de

los receptores beta adrenérgicos en la hipertrofia derecha inducida por MCT (Ishikawa et al., 1991) y desensibilización de estos (Hartupee y Mann, 2017), disminución en la recaptura de noradrenalina (Leineweber, Seyfarth y Brodde 2000), incremento en la expresión de genes para la enzima convertidora de angiotensina, péptido natriurético cerebral y ET-1 (Lourenço et al., 2006), disminución en la VFC y alteraciones en la sensibilidad barorrefleja (Floreá y Cohn, 2014).

En 1993, Himura et al, demostraron los cambios en la inervación simpática cardiaca en modelos caninos de insuficiencia cardiaca derecha mediante avulsión de la válvula tricúspide utilizando la técnica de ácido glioxílico e inmunocitoquímica para TH, donde concluyeron que, mediante las dos técnicas, los perfiles catecolaminérgicos cardiacos se encuentran reducidos. A pesar de que una de las limitaciones del presente estudio fue el enfocarse únicamente a la cuantificación de marcadores parasimpáticos, esto nos remarca la importancia de aplicar técnicas para la cuantificación de marcadores simpáticos en VD que podrían implementarse a futuro en este proyecto para confirmar los resultados obtenidos (Himura et al., 1993).

Desde hace décadas, se ha determinado que en la insuficiencia cardiaca existe una condición de hiperexcitación neurohumoral caracterizada por activación del sistema nervioso simpático y el eje renina angiotensina aldosterona (Floras, 1993), sin embargo, la investigación a nivel básico y clínico se ha orientado con una mayor inclinación al área simpática. Ya que el sistema nervioso simpático actúa en conjunto con el parasimpático, también es necesario resaltar la importancia de este último con el objetivo de aportar información para nuevas estrategias de tratamiento o nuevos blancos terapéuticos como la estimulación del nervio vago para aumentar el tono parasimpático (Olshansky et al., 2008). En relación a nuestros hallazgos con respecto a la cuantificación de *AChE* como marcador parasimpático indirecto, esta es la primera vez que se logra demostrar la utilidad del método de Ellman como técnica colorimétrica para la cuantificación de acetilcolinesterasa en múltiples tejidos de la vía circulatoria en serie:

*AD>VD>AP>Pulmón>AI>VI>Aorta>Suero*, además de que caracterizamos los cambios cuantitativos desde una etapa normal (CTRL), en la hipertrofia sin administración del fármaco (CTRL + HVD), en la hipertrofia inducida por MCT, y en un modelo de cardiomegalia compatible con insuficiencia cardiaca en cada uno de ellos.

Por medio de la técnica colorimétrica utilizada logramos corroborar la disminución, disfunción y atenuación parasimpática de VD en la hipertrofia e IC que se ha visto en investigaciones previas (Yamada et al., 1991; Machado et al., 2000; Sanyal et al., 2012; Mühlfeld et al., 2013; Binkley et al., 1991), así como también el incremento a nivel circulatorio (Olshansky et al., 2008). Esto nos confirma las diferencias planteadas hipotéticamente, que los cambios en la inervación ventricular derecha en el proceso de evolución hacia IC adquieren un carácter dependiente del tiempo, en relación a diferentes etapas en las que se encuentre el padecimiento de esta condición. En relación al incremento significativo en la aurícula derecha en el grupo MCT también representado por Yamada et al., en 1991, este puede deberse a la gran cantidad de inervación intrínseca propia de la cámara (Lee et al., 2018; Shenton et al., 2020) y al impacto del daño directo primero en el VD y posteriormente en la AD, lo que representa una posibilidad de que esta cámara auricular se haya encontrado en una fase de menor daño caracterizada por hiperinervación y posterior hipoinervación en el grupo CARD. Para el caso del VI este no presentó cambios significativos sino hasta la etapa más avanzada (CARD), lo que podemos enlazar con los resultados obtenidos macroscópicamente, los cuales tuvieron un comportamiento similar. Curiosamente un fenómeno observado fue una disminución descendente en las cantidades de AChE también a nivel auricular izquierdo. Ya que en el análisis reflejó la remodelación parasimpática como una disminución escalonada del marcador utilizado, podemos establecer que: El grado de alteración en la inervación parasimpática es proporcional a la severidad del estímulo que se esté presentando, por lo que a mayor tiempo de evolución, mayor hipertrofia, y mayor sobrecarga de presión en el VD, mayor va a ser el grado de disminución y disfunción de la inervación intrínseca parasimpática del VD, así como también, mayor va a ser el compromiso de la integridad de las otras cavidades. A pesar de que en este proyecto se observó una disminución en la cuantificación de AChE de VD, trabajos previos desarrollados en el laboratorio de fisiología cardiovascular se ha observado un incremento en el marcaje de VD aplicando la técnica histológica de AchE por el método de Karnovsky (Trujillo, 2012). Esto puede a la diferente cepa del modelo animal utilizado para dicho protocolo.

Existe evidencia de que el tejido pulmonar se encuentra inervado por fibras simpáticas y parasimpáticas, y que estas últimas inervan la membrana muscular que rodea el epitelio de los bronquios y el parénquima pulmonar (Wojtarowicz, Podlasz y Czaja, 2003).

En relación a los resultados que nos indicaron una disminución de AChE a nivel pulmonar, sabemos que el modelo de hipertensión arterial pulmonar inducida por MCT presenta una gran diversidad de alteraciones en las estructuras vasculares pulmonares que tienden a estar muy inervadas, como: obliteración de arteriolas, disfunción endotelial, hipertrofia de la capa media, engrosamiento y fibrosis de la adventicia (Bogaard et al., 2010; Piao, Marsboom y Archer, 2010; Okumura et al., 2015; Schermuly et al., 2004), culminando en fibrosis intersticial pulmonar (Hayashi et al., 1995) y arteritis pulmonar necrotizante (Wilson et al., 1992), entre otros. Por lo que la presencia de fibrosis, inflamación y disminución en el diámetro de la luz vascular pueden producir limitación en el flujo sanguíneo hacia el tejido pulmonar, disminuyendo el aporte de substratos y oxígeno para las fibras nerviosas perivasculares, y debido a la gran susceptibilidad de estas a la isquemia e hipoxia, esto promovería que culminen en daño y degeneración. Adicionalmente, el análisis realizado reflejó la presencia de una mayor cantidad de AChE en las cámaras cardiacas derechas (AD y VD) en comparación con pulmón y arteria pulmonar, lo que podría traducirse en una heterogeneidad de inervación colinérgica en estas diferentes regiones.

El óxido nítrico tiene una gran diversidad de acciones en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos del sistema cardiovascular. Es sintetizado por 3 diferentes isoformas de sintasas de NO que han sido identificadas como neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS) las cuales son reguladas por  $Ca^{2+}$  y expresadas no solo en tejido nervioso y endotelial respectivamente, sino también en muchos otros tipos de células. La isoforma adicional es de naturaleza inducible (iNOS) y esta puede ser expresada por diferentes tipos celulares mediante ciertos estímulos específicos (Shah y MacCarthy, 2000). La óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) es la principal fuente endógena de óxido nítrico miocárdico (NO), que facilita la relajación miocárdica y modula la contracción, además de regular el  $Ca^{2+}$  intracelular, las vías de señalización y la homeostasis oxidativa, sin embargo, la isoforma neuronal e inducible, incrementan su expresión desde las fases tempranas de estímulos patogénicos y desempeñan un papel fundamental en el intento por brindar protección al miocardio durante un aumento del estrés oxidativo, disfunción sistólica / diastólica, adversidades de remodelación estructural y fallo cardiaco (Zhang et al., 2014).

Es importante destacar que la expresión y actividad de la nNOS e iNOS aumenta en el miocardio de un corazón enfermo donde hay presencia de inflamación, como en la lesión por isquemia-reperfusión (Hu et al., 2006; Aragón et al., 2011), hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Vejlstrup., et al 1998; Damy et al., 2003, 2004; Niu et al., 2012; Carnicer et al., 2013), además de aumento de su expresión en tejido pulmonar de las isoformas neuronal y endotelial en roedores con hipertensión pulmonar (Fagan et al., 2001). La cuantificación de nitritos en homogenados de tejidos (*AD>VD>AP>Pul>AI>VI>Aorta>Suero*) por la reacción de Griess, reflejo un incremento en VD, VI, y suero, más acentuada en el grupo con cardiomegalia y en pulmón para el grupo con MCT, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos por los investigadores mencionados anteriormente. Sin embargo, en vasos sanguíneos y aurícula no se encontraron cambios significativos posiblemente por la menor cantidad de tejido que tienen estas estructuras, la sensibilidad de la reacción o errores técnicos, por lo que sugerimos volver a reproducir estos análisis para establecer resultados con mayor seguridad.

## 11. Conclusiones

1. Las alteraciones generadas en el VD en presencia de cardiomegalia pueden llegar a afectar la integridad del VI.
2. El análisis morfométrico por la técnica de Golgi Cox demostró que la densidad y presencia tanto de ganglios como de fibras de la inervación intrínseca del VD disminuyen en etapas severas de daño ventricular derecho.
3. El daño a las estructuras de la inervación intrínseca cardíaca demostró ser de mayor severidad en el endocardio en el análisis de diámetros ganglionares, posiblemente debido sobrecarga de presión y a la mayor área de superficie endocárdica con la que cuenta la cámara ventricular derecha.
4. La hipoinervación en la hipertrofia e IC puede deberse a una gran variedad de mecanismos como: estrés mecánico, isquemia, sobre estimulación neurohumoral o apoptosis.
5. En cuanto al análisis cualitativo de la inervación simpática por la técnica de ácido glioxílico, se observaron cambios asociados a una reducción de la fluorescencia, lo que sugiere una disminución en el contenido de adrenalina y noradrenalina en el VD.
6. El método de Ellman es de gran utilidad para la evaluación de la actividad de AchE en diferentes tejidos que involucran al sistema cardiovascular, demostrando posiblemente la heterogeneidad en la inervación parasimpática presente en estas diferentes regiones.
7. La remodelación de la inervación parasimpática es diferente durante la fase de hipertrofia y durante la presencia de IC, además de ser proporcional a la severidad del estímulo que la genera, por lo que, a mayor tiempo de evolución del proceso fisiopatológico, mayor es el grado de disminución y disfunción de la inervación intrínseca parasimpática del VD.
8. En el modelo de cardiomegalia, el análisis de los tejidos demostró un incremento de nitritos en VD, VI y suero, lo que podría deberse al aumento en la expresión de la isoforma inducible de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) en la IC.

En el presente estudio, probamos la hipótesis de que la progresión de la hipertrofia a insuficiencia cardiaca se acompaña de cambios en la inervación cardiaca. En conclusión, este estudio proporciona evidencia morfológica cualitativa y cuantitativa para la reducción deletérea de la inervación cardiaca en la HVD inducida por monocrotalina. Sugerimos que la disminución de la densidad de las fibras nerviosas es tiempo-dependiente durante el proceso fisiopatológico y puede contribuir a la descompensación y remodelación ventricular adversa y al aumento del potencial arritmogénico letal en el proceso de hipertrofia e IC. Nuestros datos corroboran una clara correlación existente entre el grado de severidad y evolución de la hipertrofia e insuficiencia cardiaca y la remodelación de la inervación intrínseca ventricular derecha que puede traducirse en una disminución en la inervación a nivel histológico de forma cuantitativa por la técnica de Golgi-Cox, cualitativa por Ácido Glioxílico y AChE y por cuantificación de AChE como marcador de inervación parasimpática. Debido a los resultados obtenidos, sugerimos que la remodelación parasimpática y la liberación de otros factores podría estar alterada también en otros tejidos como lo son las aurículas, VI, pulmón y grandes vasos, por lo que se propone continuar con esfuerzos significativos en la investigación en relación con estos hallazgos y así poder proporcionar nuevos planteamientos sobre el proceso de remodelación de la inervación intrínseca cardiaca y como este participa en la progresión de este síndrome clínico.

## 12. Anexos

### 12.1 Técnica de Golgi Cox

Los corazones destinados para esta técnica fueron desmontados y sumergidos inmediatamente en solución Golgi Cox compuesta por dicromato de potasio al 5 %, cloruro de mercurio al 5 %, agua destilada y cromato de potasio al 5 % durante un periodo de 4 semanas en total oscuridad, llevando a cabo recambios de la solución semanalmente. Retirados de la solución los corazones fueron sumergidos en una solución de sacarosa al 30 % por un periodo de 3-4 días con el fin de proporcionar mayor firmeza a los tejidos y así poder facilitar la obtención de cortes. Posteriormente con ayuda de un vibratomo (Cambden instrument, MA752, Leicester, UK) se obtuvieron cortes longitudinales de los corazones de 200  $\mu\text{m}$  tratando de observar en ellos ambas cavidades con sus respectivas 3 capas histológicas (epicardio, miocardio y endocardio) así como también su separación a través del septum interventricular. Finalmente, los cortes fueron montados en laminillas cubiertas con gelatina microbiológica para ser reveladas mediante la técnica:

1. Enjuague en agua destilada por 5 min.
2. Sumergir en Hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) 30 min.
3. Enjuague en agua destilada por 5 min.
4. Sumergir en Fijador fotográfico (Kodak Cat 197, 1746) 30 min.
5. Enjuague en agua destilada por 5 min.
6. Deshidratar en Alcoholes 70 % 95 % 100 %: 1 min, 1 min, 10 min respectivamente.
7. Sumergir en Xilol 15 min.
8. Cubrir con resina líquida.
9. Dejar secar al aire evitando el contacto con la luz.

Análisis Morfométrico: Los ganglios y células cardiacas impregnadas por la técnica de Golgi-Cox fueron fácilmente identificados por las siguientes características:

1. Impregnación completa del ganglio o célula nerviosa en el tejido cardiaco
2. Localización y tamaño del ganglio y cuerpo celular

3. Presencia de al menos dos prolongaciones citoplasmáticas y que cada una de estas se ramifiquen al menos 1 vez
4. Ningún cambio morfológico atribuible a la técnica Golgi-Cox (Gómez et al., 2009).

Cuando el soma tiene un tamaño menor a 30  $\mu\text{m}$  ya sea en el eje largo o corto se considera como un ganglio y cuando sea mayor se considera como una célula cardiaca aislada. Se analizó el miocardio y endocardio en la porción medial del VD obteniendo 10 ganglios correspondientes a cada área. Los ganglios fueron analizados mediante una cámara lúcida adaptada a un microscopio de luz (Leica DME) y un software (Leica Application Suite V3.8) que nos permiten realizar el estudio de una forma manual y digital; manualmente mediante dibujos en papel y midiendo diámetro mayor y diámetro menor con una regla. También se determinó la densidad ganglionar por mm cuadrado por cada corazón dibujando ganglios a una escala de un recuadro de 14x14 cm.

## 12.2 Tinción de acetilcolinesterasa por el método de Karnovsky

### Materiales:

1. Laminillas de tejido fresco no fijado y cortes de 15-20 micras.
2. Solución Karnovsky

REACTIVOS	SOLUCIONES STOCK	Para preparar 10 ml agregar:
1. Acetilcolina		5 mg por cada 10 ml de solución a preparar
2. Buffer de acetato de sodio trihidratado	Para prepararlo mezclar 0.136 g y disolverlo en 10 ml de H <sub>2</sub> O tridestilada	6.5 ml del stock
3. Citrato de sodio (.1M)	Para prepararlo mezclar 0.294 g y disolverlo en 10 ml de H <sub>2</sub> O tridestilada	0.5 ml del stock
4. Sulfato de cobre (30mM)	Para prepararlo mezclar 0.058 g y disolverlo en 10 ml de H <sub>2</sub> O tridestilada	1 ml del stock
5. Agua		1 ml por cada 10 ml

6.	Hexacianoferrato de potasio	Para prepararlo mezclar 0.0165 g y disolverlo en 10 ml de H <sub>2</sub> O tridestilada ( 2 cristales pequeños)	1 ml del stock
TOTAL			10 ml

Preparación de solución Karnovsky:

1. Agregar en orden los reactivos y mezclar bien
2. Agregar los diferentes componentes de la solución con pipetas automáticas para que sean exactos.
3. Verificar un pH final de la solución a 6.0

Técnica rápida para visualización de fibras nerviosas:

1. Sumergir las laminillas en solución Karnovsky por un periodo de 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante.
2. Enjuagar con agua tridestilada para retirar el exceso de solución  
(En este paso en caso de requerirse otra contratinción se realiza)
3. Llevar a cabo la deshidratación de los tejidos a través de la exposición con alcohol a diferentes concentraciones:
  - a. Alcohol al 70 %.....1 minuto
  - b. Alcohol al 95 %..... 1 minuto
  - c. Alcohol al 100 %.....10 minutos
4. Posteriormente fijar los tejidos con Xilol durante 15 minutos
5. Colocar resina y cubreobjetos
6. Dejar secar espontáneamente a temperatura ambiente

12.3 Contratinción hematoxilina/eosina

1. Después del paso 2 de la técnica de acetil colinesterasa sumergir las laminillas de 5 a 10 segundos en hematoxilina de Harris
2. Enjuagar bajo chorro de agua por 2 min

3. Sumergir las laminillas 1-3 segundos en eosina
4. Enjuagar en chorro de agua 10 segundos
5. Llevar a cabo la deshidratación de los tejidos a través de la exposición con alcohol a diferentes concentraciones:
  - a. Alcohol al 70 %.....1 minuto
  - b. Alcohol al 95 %..... 1 minuto
  - c. Alcohol al 100 %.....10 minutos
6. Posteriormente fijar los tejidos con xilol durante 15 minutos
7. Colocar resina y cubreobjetos
8. Dejar secar espontáneamente a temperatura ambiente

#### 12.4 Técnica de ácido Glioxílico por el método de la Torre

##### Materiales:

1. Laminillas de tejido fresco no fijado y cortes de 15-20 micras
2. Solución de ácido glioxílico sal sódica (Sigma-Aldrich Chem. EUA)
3. Resina epóxica
4. Estufa de calentamiento

##### Preparación de la solución de ácido Glioxílico 2 %

1. 0.1 M Buffer Fosfato (agregar gotas de NaOH hasta tener un pH de 7) 45 ml.
2. Ácido glioxílico monohidrato (HOOC.CHO.H<sub>2</sub>O) 1 g.
3. Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) 0.25 g.
4. H<sub>2</sub>O hasta aforar a 50 ml.
5. Checar pH de 7.0

Preparar la solución en una caja Coplin inmediatamente antes de su uso. Se realiza a temperatura ambiente.

##### Procedimiento:

1. Cortar las secciones de tejido en criostato y colocar en las laminillas.

2. Sumergir las laminillas en la solución de ácido Glioxílico e incubar por 30 min a temperatura ambiente.
3. Secar las laminillas suavemente con papel filtro y calentar en parrilla eléctrica durante 5 min a 100°C hasta obtener un color café claro.
4. Colocar resina epóxica, cubreobjetos y dejar secar al ambiente para observar al microscopio.

## 12.5 Cuantificación de AChE por el método de Ellman

Utilizar placa de 96 pozos

Para la determinación de acetilcolinesterasa se utilizó el método de Ellman modificado, se realizaron 10 ensayos preliminares para estandarización de la curva, concentración de reactivos utilizados y cantidad a utilizar en la placa tanto para curva y muestras.

El método consiste en:

1. Preparación de buffer de fosfatos con pH de 8 y molaridad de 0.1 M.
2. Utilizar una placa multipozos (96 pozos)
3. El volumen final de todos los pozos será de 115  $\mu$ l
4. Realización de la curva (realizar curva por duplicado): para establecer el blanco colocar 100 de buffer fosfato pH 8 y 10  $\mu$ l de DTNB (el DTNB se agrega hasta el final) y 5  $\mu$ L de AChT 5 mM
5. En todos los pozos que se utilizarán para la curva, colocar 100 de buffer fosfato pH 8 (excepto en fila H), ahí se pondrán 180
6. Iniciar curva en fila H colocando 20  $\mu$ l de solución de Acetilcolinesterasa (Sigma Aldrich®) que equivale a 2 Unidades o 2000 miliunidades. Mezclar bien y tomar 100 microlitros para pasarlos al pozo contiguo (G) y así sucesivamente mezclar mediante pipeteo con la cantidad de buffer agregada previamente, hasta llegar a la fila B, donde se desechan 100  $\mu$ l. obteniendo las siguientes diluciones del pozo H al A = 1000 mU, 500 mU, 250 mU, 125 mU, 62.5 mU, 31.2 mU, 15.5 mU, 0 mU.

7. Colocar muestras para medir actividad de acetilcolinesterasa por duplicado de la siguiente manera:
8. Para las muestras de homogéneo y suero se colocan 90 de buffer por duplicado.
9. Posteriormente se agregan 10 ul de muestra, y 10 ul de DTNB.
10. Se incuba la placa a 26 °C durante 20 minutos.
11. Se realiza una lectura basal.
12. Agregar 5 de Yoduro de acetiltiocolina al 5 mM a todos los pozos de las muestras.
13. Se observa un cambio de coloración instantáneo. Coloración amarilla. Por lo que se tendrá que leer de inmediato a los 3, 5, 7 y 10 min
14. Leer en espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm.
15. La actividad enzimática se calcula de la siguiente forma:
  - a. Tomar como referencia el valor de absorbancia obtenido a los 10 minutos, y dividirlo entre 10. Esa es la actividad enzimática obtenida en 1 minuto.
  - b. Restar el valor de absorbancia de los pozos blanco (solo con el buffer) a sí mismo, a la curva y a las muestras, esta es la lectura corregida.
  - c. Determinar el valor promedio de la curva y muestra que se encuentran por duplicado.
  - d. Graficar los valores de lectura de la curva estándar como una función de la cantidad de AChE.
  - e. Calcular la ecuación línea de tendencia basada en los datos de la curva estándar y analizar los datos por regresión lineal.

#### 12.6 Determinación de nitritos por la reacción de Griess

1. Para esta determinación se emplea una placa de 96 pozos.
2. Para la curva estándar, se emplearán las primeras 2 columnas, ya que la curva estándar se realiza por duplicado.
3. Colocar 100 µl de agua electropura en la fila 1 y 2 (por duplicado).
4. Tomar 100 µl de solución de NO<sub>2</sub> 10 mM y colocarlos en los últimos dos pozos y homogeneizarlos con el agua.

5. Tomar 100  $\mu$ l del último pozo (H) y homogeneizar por duplicado toda la curva hasta llegar a la fila B donde se homogeniza y se desechan 100  $\mu$ l dejando la A sólo con agua electropura como blanco.
6. Para las muestras de ventrículos se colocan 20  $\mu$ l de homogenado + 80  $\mu$ l de agua Electropura. Para aurículas, pulmón, arterias y suero desproteinizado se colocan 50  $\mu$ l de homogenado y 50  $\mu$ l de agua Electropura
7. Agregar 100 $\mu$ l de reactivo Griess <sup>1</sup> a la curva estándar y a todas las muestras para un volumen final de 200  $\mu$ l por pozo
8. Incubar 30 min a 37 °C y realizar la lectura en espectrofotómetro a 540 nm.

---

<sup>1</sup> Reactivo de Griess: 100mg de sulfanilamida disuelta en 7 ml de ácido fosfórico al 5 %, 10 mg de NEED disueltos en 1 ml de ácido fosfórico 5 %. Mezclar y aforar a 10 ml.

## 12.7 Clasificación de la insuficiencia cardiaca

El síndrome de IC tiene una amplia variedad de clasificaciones desde diferentes puntos de vista y diferentes criterios tanto en el área de investigación como en el ámbito clínico. Existen hoy en día diferentes categorizaciones que se le otorgan a la IC, una de ellas demuestra en 4 subcategorías (I-IV) basadas en la limitación física que un paciente presenta cuando se somete a cierta actividad física impuesta desde un punto de vista funcional por la Asociación del Corazón de Nueva York (NYHA). Además, el Colegio Americano de Cardiología y la Asociación Americana del Corazón (ACC/AHA) llevaron a cabo una clasificación adicional en relación con parámetros estacionales, basándose en nuevamente 4 subcategorías, pero relacionadas con el estadio de evolución en el que se encuentra el síndrome y la aparición de síntomas (A-D) (2009).

**Tabla 2.- Comparación de los Estadios de IC de la ACCF/AHA y la Clasificación Funcional NYHA**

Estadios de IC de la ACCF/AHA		Clasificación Funcional NYHA	
<b>A</b>	Alto riesgo de IC pero sin enfermedad cardiaca estructural ni sintomatología de IC	<b>Ninguno</b>	
<b>B</b>	Enfermedad cardiaca estructural pero sin síntomas ni signos de IC	<b>I</b>	Sin limitación para la actividad física. La actividad física habitual no causa síntomas de IC
<b>C</b>	Enfermedad cardiaca estructural con síntomas iniciales o habituales de IC	<b>I</b>	Sin limitación para la actividad física. La actividad física habitual no causa síntomas de IC
		<b>II</b>	Ligera limitación para la actividad física. Confortable en el reposo, pero la actividad física habitual provoca síntomas de IC
		<b>III</b>	Marcada limitación para la actividad física. Confortable en el reposo, pero la actividad física inferior a la habitual provoca síntomas de IC
<b>D</b>	IC refractaria que requiere intervenciones especializadas	<b>IV</b>	Imposible llevar cualquier actividad física sin presentar síntomas de IC, o síntomas de IC con el reposo

ACCF: Fundación de la Academia Americana de Cardiología; AHA: Asociación Americana del Corazón; NYHA: Asociación Del Corazón de Nueva York; IC: Insuficiencia cardiaca.

Comparación de ACCF/AHA sobre los estadios de la IC y clasificaciones funcionales de la NYHA. Dos importantes clasificaciones de IC basadas en criterios de ACCF/AHA y NYAH. Del lado izquierdo (A-D) se pueden observar las categorías de clasificación en relación con aparición de síntomas y presencia de cambios estructurales. En el lado derecho (I-IV) se representaron las cinco subcategorías que la NYHA estableció en relación a la limitación que presenta un paciente al someterse a actividad física (Yancy et al., 2013).

En relación a la función ventricular, es posible tomar en cuenta parámetros hemodinámicos y retomar otro tipo de clasificación. Un ejemplo de esto es la clasificación de ACCF/AHA en relación con la fracción de eyección ventricular. La FE es una de las medidas más importantes del funcionamiento cardíaco y una caracterización de la eyección ventricular: el volumen sistólico (VS) expresado como una fracción del volumen diastólico final (VDF). El conocimiento de la VDF es esencial para traducir el VS expresado como un porcentaje (FE) en SV absoluto, una cantidad de mayor importancia fisiológica y clínica (Konstam y Abboud, 2017). Por lo cual dicha clasificación está basada en el porcentaje de FE en la IC teniendo dos categorías: 1. HFrEF (insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida) encontrándonos con valores iguales o menores a un 40 % y 2. HFpEF (insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada) igual o mayor al 50 % de la FE y con dos subcategorías (límitrofe o implementada) en la cual no se ve una afectación significativa en la FE.

Además de las clasificaciones mencionadas anteriormente, existen otros criterios de clasificación muy importantes y que son retomados continuamente en la investigación. Estas clasificaciones adicionales están estructuradas en base a la actividad cardíaca y a las regiones anatómicas comprometidas.

En base a la alteración de la función cardíaca ventricular:

- A. Insuficiencia cardíaca sistólica: donde el proceso sistólico ventricular está comprometido debido a una alteración en el proceso de contracción ventricular
- B. Insuficiencia cardíaca diastólica: dónde está comprometido proceso diastólico ventricular a través de alteraciones para llevar a cabo el proceso de relajación correctamente

## 12.8 Neurotransmisores a nivel cardiaco

### 12.8.1 Norepinefrina

El transmisor neuronal simpático norepinefrina (NE) se sintetiza a partir de tirosina. Primero, se convierte en dopamina por enzimas citoplasmáticas. La dopamina luego se transporta a las vesículas intraneuronales, donde se sintetiza y almacena en NE. Tras la estimulación neuronal, las vesículas se fusionan con la membrana presináptica y liberan el NE en la hendidura. El NE liberado se une a los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\beta_2$  postsinápticos, que son receptores acoplados a la proteína G, para transducir señales para mejorar el acoplamiento de excitación-contracción del miocardio y aumentar la frecuencia y la fuerza cardiaca. La hendidura NE también activa los receptores presinápticos  $\alpha_2$ -adrenérgicos para inhibir la liberación adicional de NE. El efecto del NE es terminado por dos mecanismos: aproximadamente el 80 % del NE es llevado al área presináptica por un proceso activo dependiente de ATP a través de un transportador llamado transportador de noradrenalina humana 1 (hNET1; sistema de captación-1), mientras que el resto se extiende al tejido no neuronal y al torrente sanguíneo (sistema de captación-2). Por lo tanto, varias moléculas en esta vía pueden servir como objetivos para la imagen funcional del tono simpático en el corazón (Haider N, et al. 2010). En condiciones normales, al unirse las catecolaminas, los adrenoceptores cambian la conformación, se acoplan y activan Gas, y de este modo inician varias cascadas de señalización intracelular que finalmente conducen a una mayor contractilidad activando la adenilato ciclasa (AC) y la proteína cinasa A (PKA) (Woodall et al. 2014).

### 12.8.2 Acetilcolina

La acetilcolina es el principal neurotransmisor parasimpático en la innervación cardiaca, es sintetizada en el citoplasma neuronal a partir de la unión de colina con ácido acético, en presencia de Acetil-CoA; y, posteriormente, es almacenada en las vesículas sinápticas, en las que se transporta a las terminaciones nerviosas donde se utiliza para la transmisión del impulso nervioso. El aumento de la estimulación parasimpática disminuye la

frecuencia cardiaca al disminuir la velocidad de descarga del nodo SA y la velocidad de conducción del nodo AV. En el miocardio ventricular, el receptor postsináptico primario de la acetilcolina es el receptor muscarínico de tipo M2, que está unido a una adenilato ciclasa. La activación de este receptor por acetilcolina disminuye el AMPc intracelular, reduciendo así la contractilidad. En el tejido auricular y nodal, los receptores M2 activan otra proteína G, que causa un aumento en el flujo de K al inducir directamente la apertura del canal K con lo que también altera la función cardiaca (Triposkiadis et al., 2009).

### 13. Referencias

- A. C. Nostrandt, J. A. Duncan, S. Padilla. (1993). A Modified Spectrophotometric Method Appropriate for Measuring Cholinesterase Activity in Tissue from Carbaryl-Treated Animals, *Toxicological Sciences*, Volume 21, Issue 2, August Pages 196–203, <https://doi.org/10.1093/toxsci/21.2.196>.
- Adarmes, H, Solís, JP, Müller, A, & Galleguillos, M. (2009). Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. *Archivos de medicina veterinaria*, 41(3), 255-259. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2009000300010>
- Aiello, E. A., Villa-Abrille, M. C., Escudero, E. M., Portiansky, E. L., Pérez, N. G., de Hurtado, M. C., & Cingolani, H. E. (2004). Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 286(4), H1229–H1235. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00779.2003>
- André P. Lourenço, Roberto Roncon-Albuquerque, Jr., Carmen Brás-Silva, Bernardo Faria, Joris Wieland, Tiago Henriques-Coelho, Jorge Correia-Pinto, and Adelino F. Leite-Moreira. (2006). Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 291: 4, H1587-H1594.
- Anker, S. D., & von Haehling, S. (2004). Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart (British Cardiac Society)*, 90(4), 464–470. <https://doi.org/10.1136/hrt.2002.007005>
- Anna M. D. Watson, Rasim Mogulkoc, Robin M. McAllen, and Clive N. May. (2004). Stimulation of cardiac sympathetic nerve activity by central angiotensinergic mechanisms in conscious sheep. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286:6, R1051-R1056.
- Aragón, J. P., Condit, M. E., Bhushan, S., Predmore, B. L., Patel, S. S., Grinsfelder, D. B., Gundewar, S., Jha, S., Calvert, J. W., Barouch, L. A., Lavu, M., Wright, H. M., & Lefer, D. J. (2011). Beta3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(25), 2683–2691.
- Armour J. A. (2008). Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. *Experimental physiology*, 93(2), 165–176. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2>
- Arora, R., Waldmann, M., Hopkins, D. and Armour, J. (2003), Porcine intrinsic cardiac ganglia. *Anat. Rec.*, 271A: 249-258. doi: 10.1002/ar.a.10030
- Author links open overlay panelJ.C.de la Torre. (1980). Standardization of the sucrose-potassium phosphate-glyoxylic acid histofluorescence method for tissue monoamines. *Neuroscience Letters*
- Axelsson, S., Björklund, A., Falck, B., Lindvall, O., & Svensson, L. A. (1973). Glyoxylic acid condensation: a new fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines. *Acta physiologica Scandinavica*, 87(1), 57–62. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1973.tb05365.x>
- Benoist, D., Stones, R., Drinkhill, M., Bernus, O., & White, E. (2011). Arrhythmogenic substrate in hearts of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 300(6), H2230–H2237. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01226.2010>
- Bernardo Nadal-Ginard, Jan Kajstura, Annarosa Leri, and Piero Anversa. (2013). Myocyte Death, Growth, and Regeneration in Cardiac Hypertrophy and Failure. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000053618.86362.DF> *Circulation Research*. 2003; 92:139–150.

- Binkley, P. F., Nunziata, E., Haas, G. J., Nelson, S. D., & Cody, R. J. (1991). Parasympathetic withdrawal is an integral component of autonomic imbalance in congestive heart failure: demonstration in human subjects and verification in a paced canine model of ventricular failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 18(2), 464–472. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(91\)90602-6](https://doi.org/10.1016/0735-1097(91)90602-6)
- Bogaard, H. J., Natarajan, R., Mizuno, S., Abbate, A., Chang, P. J., Chau, V. Q., Hoke, N. N., Kraskauskas, D., Kasper, M., Salloum, F. N., & Voelkel, N. F. (2010). Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(5), 652–660. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0335OC>
- Brack, K.E., Patel, V.H., Coote, J.H. and Ng, G.A. (2007), Nitric oxide mediates the vagal protective effect on ventricular fibrillation via effects on action potential duration restitution in the rabbit heart. *The Journal of Physiology*, 583: 695-704. doi:10.1113/jphysiol.2007.138461
- Braunwald E. (2008). Biomarkers in heart failure. *The New England journal of medicine*, 358(20), 2148–2159. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0800239>
- Brian Olshansky, MD, Hani N. Sabbah, PhD, Paul J. Hauptman, MD and Wilson S. Colucci, MD. (2008). Parasympathetic Nervous System and Heart Failure. *Circulation*. 2008; 118:863–871
- Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free radical biology & medicine*, 43(5), 645–657. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026>
- Carnicer, R., Crabtree, M. J., Sivakumaran, V., Casadei, B., & Kass, D. A. (2013). Nitric oxide synthases in heart failure. *Antioxidants & redox signaling*, 18(9), 1078–1099. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4824>
- Cavallotti, D., Artico, M., Iannetti, G., & Cavallotti, C. (2000). Quantification of acetylcholinesterase-positive structures in human thymus during development and aging. *Neurochemistry international*, 36(1), 75–82. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(99\)00090-x](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(99)00090-x)
- Chang-seng Liang MD, PhD, Naomi Kenmotsu Rounds , MD , Erdan Dong , MD, PhD , Suzanne Y. Stevens , PhD , Junya Shite , MD , and Fuzhong Qin , MD. (2000). Alterations by Norepinephrine of Cardiac Sympathetic Nerve Terminal Function and Myocardial  $\beta$ -Adrenergic Receptor Sensitivity in the Ferret. *Circulation*. 2000; 102:96–103.
- Charlotte Farah, Lauriane Y. M. Michel and Jean-Luc Balligand. (2018). Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews*, Published online 1 Feb doi:10.1038/nrcardio.2017.224
- Chen, L., Gan, X. T., Haist, J. V., Feng, Q., Lu, X., Chakrabarti, S., & Karmazyn, M. (2001). Attenuation of compensatory right ventricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 298(2), 469–476.
- Cho, K. H., Kim, J. H., Murakami, G., Abe, H., Rodríguez-Vázquez, J. F., & Chai, O. H. (2019). Nerve distribution in myocardium including the atrial and ventricular septa in late stage human fetuses. *Anatomy & cell biology*, 52(1), 48–56. <https://doi.org/10.5115/acb.2019.52.1.48>
- Cho, K. H., Kim, J. H., Murakami, G., Abe, H., Rodríguez-Vázquez, J. F., & Chai, O. H. (2019). Nerve distribution in myocardium including the atrial and ventricular septa in late stage human fetuses. *Anatomy & cell biology*, 52(1), 48–56. <https://doi.org/10.5115/acb.2019.52.1.48>
- Claudio Ceconi, Enrico Condorelli, Marzia Quinzanini, Anna Rodella, Roberto Ferrari, Peter Harris, Noradrenaline, atrial natriuretic peptide, bombesin and neurotensin in myocardium and blood of rats in congestive cardiac failure. (1989). *Cardiovascular Research*, Volume 23, Issue 8, August Pages 674–682, <https://doi.org/10.1093/cvr/23.8.674>
- Correia-Pinto, J., Henriques-Coelho, T., Roncon-Albuquerque, R., Jr, Lourenço, A. P., Melo-Rocha, G., Vasques-Nóvoa, F., Gillebert, T. C., & Leite-Moreira, A. F. (2009). Time course and mechanisms of left ventricular systolic and diastolic dysfunction in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Basic research in cardiology*, 104(5), 535–545. <https://doi.org/10.1007/s00395-009-0017-3>

da Silva Gonçalves Bós, D., Van Der Bruggen, C., Kurakula, K., Sun, X. Q., Casali, K. R., Casali, A. G., RoI, N., Szulcek, R., Dos Remedios, C., Guignabert, C., Tu, L., Dorfmueller, P., Humbert, M., Wijnker, P., Kuster, D., van der Velden, J., Goumans, M. J., Bogaard, H. J., Vonk-Noordegraaf, A., de Man, F. S., ... Handoko, M. L. (2018). Contribution of Impaired Parasympathetic Activity to Right Ventricular Dysfunction and Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*, *137*(9), 910–924. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027451>

Damy, T., Ratajczak, P., Robidel, E., Bendall, J. K., Oliviero, P., Boczkowski, J., Ebrahimian, T., Marotte, F., Samuel, J. L., & Heymes, C. (2003). Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*(13), 1934–1936. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1208fje>

Damy, T., Ratajczak, P., Shah, A. M., Camors, E., Marty, I., Hasenfuss, G., Marotte, F., Samuel, J. L., & Heymes, C. (2004). Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet (London, England)*, *363*(9418), 1365–1367. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16048-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16048-0)

Damy, T., Ratajczak, P., Shah, A. M., Camors, E., Marty, I., Hasenfuss, G., Marotte, F., Samuel, J. L., & Heymes, C. (2004). Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet (London, England)*, *363*(9418), 1365–1367. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16048-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16048-0)

Damy, Thibaud & Ratajczak, P. (2004). Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. 734-734.

Daniela Giustarini, Isabella Dalle-Donne, Dimitrios Tsikas, Ranieri Rossi. (2009) Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 46:5-6, pages 241-281.

de la Torre, J.C., Surgeon, J.W. (1976). A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: The SPG method. *Histochemistry* 49, 81–93 <https://doi.org/10.1007/BF00495672>

Deten, A., Millar, H., & Zimmer, H. G. (2003). Catheterization of pulmonary artery in rats with an ultraminiature catheter pressure transducer. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *285*(5), H2212–H2217. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00315.2003>

Dimitrios Tsikas. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B* 851(1-2):51-7 DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.07.054

Donald M. Bers. (2006). Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation in Heart Failure. *Physiology* 21:6, 380-387.

Ellman G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, *82*(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr, & Feather-stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, *7*, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Fagan, K.A., Morrissey, B., Fouty, B.W. et al. Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. (2001). *Respir Res* 2, 306

Faquan Liang, Jessica O’Rear, Ute Schellenberger, Lungkuo Tai, Michael Lasecki, George F. Schreiner, Fred S. Apple, Alan S. Maisel, N. Stephen Pollitt, Andrew A. Protter. (2007). Evidence for Functional Heterogeneity of Circulating B-Type Natriuretic Peptide. *J Am Coll Cardiol. Mar*, *49* (10) 1071-1078.

Filippos Triposkiadis, George Karayannis, Grigorios Giamouzis, John Skoularigis, George Louridas, Javed Butler. (2009). the Sympathetic Nervous System in Heart Failure. *Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. J Am Coll Cardiol. Nov*, *54* (19) 1747-1762.

- Floras J. S. (1993). Clinical aspects of sympathetic activation and parasympathetic withdrawal in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 22(4 Suppl A), 72A–84A. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(93\)90466-e](https://doi.org/10.1016/0735-1097(93)90466-e)
- Florea, V. G., & Cohn, J. N. (2014). The autonomic nervous system and heart failure. *Circulation research*, 114(11), 1815–1826.
- Florea, V. G., & Cohn, J. N. (2014). The autonomic nervous system and heart failure. *Circulation research*, 114(11), 1815–1826.
- Francis, G. S., & Tang, W. H. (2003). Pathophysiology of congestive heart failure. *Reviews in cardiovascular medicine*, 4 Suppl 2, S14–S20.
- Fukuda, K., Kanazawa, H., Aizawa, Y., Ardell, J. L., & Shivkumar, K. (2015). Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circulation research*, 116(12), 2005–2019. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304679>.
- Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria. (2013). Alcaloides Pirrolizidinicos. Elika
- Gaynor, S. L., Maniar, H. S., Bloch, J. B., Steendijk, P., & Moon, M. R. (2005). Right atrial and ventricular adaptation to chronic right ventricular pressure overload. *Circulation*, 112(9 Suppl), I212–I218. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.517789>
- Gómez-Villalobos, M. J., Gordillo, A. C., López, J. R., & Flores, G. (2009). The utility of the Golgi-Cox method in the morphological characterization of the autonomic innervation in the rat heart. *Journal of neuroscience methods*, 179(1), 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.01.004>
- Gordon F. Tomaselli and Douglas P. Zipes. (2004). What Causes Sudden Death in Heart Failure? *Circulation Research*. 2004; 95:754–763 <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000145047.14691.db>
- Gregory S. Pepper, MD; Richard W. Lee, MD. (1999). Sympathetic Activation in Heart Failure and Its Treatment with  $\beta$ -Blockade. *Arch Intern Med.*, 159(3):225-234. doi:10.1001/archinte.159.3.225
- Hardziyenka, M., Campian, M. E., Reesink, H. J., Surie, S., Bouma, B. J., Groenink, M., Klemens, C. A., Beekman, L., Remme, C. A., Bresser, P., & Tan, H. L. (2011). Right ventricular failure following chronic pressure overload is associated with reduction in left ventricular mass: evidence for atrophic remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(8), 921–928. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.08.648>
- Hartupee, J., & Mann, D. L. (2017). Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nature reviews. Cardiology*, 14(1), 30–38. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.163>
- Hasan, Wohaib & Smith, Peter. (2008). Modulation of rat parasympathetic cardiac ganglion phenotype and NGF synthesis by adrenergic nerves. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*. 145. 17-26. [10.1016/j.autneu.2008.10.012](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2008.10.012).
- Hassankhani, A., Steinhilper, M. E., Soonpaa, M. H., Katz, E. B., Taylor, D. A., Andrade-Rozental, A., Factor, S. M., Steinberg, J. J., Field, L. J., & Federoff, H. J. (1995). Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement, and hyperplasia of ectopic cells. *Developmental biology*, 169(1), 309–321. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1146>.
- Hayashi, S., Mitsumori, K., Imaida, K., Imazawa, T., Yasuhara, K., Uneyama, C., & Hayashi, Y. (1995). Establishment of an animal model for pulmonary fibrosis in mice using monocrotaline. *Toxicologic pathology*, 23(1), 63–71. <https://doi.org/10.1177/019262339502300108>
- Haywood, G. A., Tsao, P. S., von der Leyen, H. E., Mann, M. J., Keeling, P. J., Trindade, P. T., Lewis, N. P., Byrne, C. D., Rickenbacher, P. R., Bishopric, N. H., Cooke, J. P., McKenna, W. J., & Fowler, M. B. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation*, 93(6), 1087–1094. <https://doi.org/10.1161/01.cir.93.6.1087>
- Hessel, M. H., Steendijk, P., den Adel, B., Schutte, C. I., & van der Laarse, A. (2006). Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 291(5), H2424–H2430. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00369.2006>
- Hill, N. S., Gillespie, M. N., & McMurtry, I. F. (2017). Fifty Years of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension: What Has It Meant to the Field? *Chest*, 152(6), 1106–1108. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.10.007>

- Hilton, A., Jorgensen, A., Gardiner, B., Robison, S., Lambert, H.W., Morton, D. and Wisco, J. (2017), Visualization of Differential Myelinated Cardiac Plexus Fiber Innervation in Heart Failure Using the Sihler's Stain Technique. *The FASEB Journal*, 31: 585.8-585.8. doi: 10.1096/fasebj.31.1\_supplement.585.8
- Himura, Y., Felten, S. Y., Kashiki, M., Lewandowski, T. J., Delehanty, J. M., & Liang, C. S. (1993). Cardiac noradrenergic nerve terminal abnormalities in dogs with experimental congestive heart failure. *Circulation*, 88(3), 1299–1309. <https://doi.org/10.1161/01.cir.88.3.1299>
- Ho, S. Y., & Nihoyannopoulos, P. (2006). Anatomy, echocardiography, and normal right ventricular dimensions. *Heart (British Cardiac Society)*, 92 Suppl 1(Suppl 1), i2–i13. <https://doi.org/10.1136/hrt.2005.077875>
- Hoover, D. B., Tompkins, J. D., & Parsons, R. L. (2009). Differential activation of guinea pig intrinsic cardiac neurons by the PAC1 agonists maxadilan and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 (PACAP27). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 331(1), 197–203. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.155747>
- Hu, A., Jiao, X., Gao, E., Koch, W. J., Sharifi-Azad, S., Grunwald, Z., Ma, X. L., & Sun, J. Z. (2006). Chronic beta-adrenergic receptor stimulation induces cardiac apoptosis and aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury by provoking inducible nitric-oxide synthase-mediated nitrate stress. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318(2), 469–475. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.102160>
- Ieda, M., Fukuda, K., Hisaka, Y., Kimura, K., Kawaguchi, H., Fujita, J., Shimoda, K., Takeshita, E., Okano, H., Kurihara, Y., Kurihara, H., Ishida, J., Fukamizu, A., Federoff, H. J., & Ogawa, S. (2004). Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *The Journal of clinical investigation*, 113(6), 876–884. <https://doi.org/10.1172/JCI19480>
- Ishikawa, K., Berson, A. S., & Pipberger, H. V. (1971). Electrocardiographic changes due to cardiac enlargement. *American heart journal*, 81(5), 635–643.
- Ishikawa, S., Honda, M., Yamada, S., Morioka, S., & Moriyama, K. (1991). Biventricular down-regulation of beta-adrenergic receptors in right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline. *Japanese circulation journal*, 55(11), 1077–1085. <https://doi.org/10.1253/jcj.55.1077>
- J. Wink, R. van Delft, R.G.E. Notenboom, P.F. Wouters, M.C. DeRuiter, J.W.M. Plevier, M.R.M. Jongbloed. (2020). Human adult cardiac autonomic innervation: Controversies in anatomical knowledge and relevance for cardiac neuromodulation. *Autonomic Neuroscience*, Volume 227, September, 102674.
- Jaume Agüero, Kiyotake Ishikawa, Lahouaria Hadri, Carlos Santos-Gallego, Kenneth Fish, Nadjib Hammoudi, Antoine Chaanine, Samantha Torquato, Charbel Naim, Borja Ibanez, Daniel Pereda, Ana García-Alvarez, Valentin Fuster, Partho P. Sengupta, Jane A. Leopold, and Roger J. Hajjar. (2014). Characterization of right ventricular remodeling and failure in a chronic pulmonary hypertension model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 307:8, H1204-H1215.
- Javier Sanz, Damián Sánchez-Quintana, Eduardo Bossone, Harm J. Bogaard and Robert Naeije. (2019). Anatomy, Function, and Dysfunction of the Right Ventricle. *J Am Coll Cardiol. Apr*, 73 (12) 1463-1482.
- José Iglesias Alfonso, Mario Estévez Báe. (2008). Regulación del Sistema Cardiovascular por el Sistema Nervioso Autónomo. *InfoWiki*. April 13, 2008, 11:41 CDT.
- Karnovsky, M. J., & Roots, I. (1964). A "Direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 12, 219–221. <https://doi.org/10.1177/12.3.219>
- Kemp, C. D., & Conte, J. V. (2012). The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 21(5), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2011.11.007>

Kensuke Kimura, Masaki Ieda, and Keiichi Fukuda. (2012). Development, Maturation, and Transdifferentiation of Cardiac Sympathetic Nerves. *Circulation Research*. 110:325–336.

Khalil Abdullah Khalil and Kasim Sakran Abass. (2017). the Measurements of the Cholinesterase Activity of Brain and Plasma in Rabbits by Using Modified Michel and Ellman Assays. *Insights in Enzyme Research* ISSN 2573-4466.

Kimura, K., Ieda, M., Kanazawa, H., Yagi, T., Tsunoda, M., Ninomiya, S., Kurosawa, H., Yoshimi, K., Mochizuki, H., Yamazaki, K., Ogawa, S., & Fukuda, K. (2007). Cardiac sympathetic rejuvenation: a link between nerve function and cardiac hypertrophy. *Circulation research*, 100(12), 1755–1764. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000269828.62250.ab>

Kinoshita O, Tomita T, Hanaoka T, Tsutsui H, Imamura H, Yazaki Y, Watanabe N, Hongo M, Kubo K. (2003). T-Wave Alternans in Patients with Right Ventricular Tachycardia. *Cardiology*; 100:86-92. doi: 10.1159/000073044.

Konstam, M. A., & Abboud, F. M. (2017). Ejection Fraction: Misunderstood and Overrated (Changing the Paradigm in Categorizing Heart Failure). *Circulation*, 135(8), 717–719. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025795>

L. Comini, G. Agnoletti, A. Panzali, G. Mantero, E. Pasini, G. Gaia, A. Albertini, and R. Ferrari. (1995). Activation of ANP synthesis during congestive heart failure in rats treated with monocrotaline. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 268: 1, H391-H398.

Lassiter, T. L., Marshall, R. S., Jackson, L. C., Hunter, D. L., Vu, J. T., & Padilla, S. (2003). Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. *Toxicology*, 186(3), 241–253. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00752-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00752-7)

Le Chen, Qizhi Gong, James P. Stice, Anne A. Knowlton. (2009). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure, *Cardiovascular Research*, Volume 84, Issue 1, 1 October, Pages 91–99.

Leger, J., Croll, R. and Smith, F. (1999), Regional distribution and extrinsic innervation of intrinsic cardiac neurons in the guinea pig. *J. Comp. Neurol.*, 407: 303-317. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990510)407:3<303: AID-CNE1>3.0.CO;2-#

Leineweber, K., Seyfarth, T., & Brodde, O. E. (2000). Chamber-specific alterations of noradrenaline uptake (uptake (1)) in right ventricles of monocrotaline-treated rats. *British journal of pharmacology*, 131(7), 1438–1444. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703698>

Levi-Montalcini, R., Skaper, S. D., Dal Toso, R., Petrelli, L., & Leon, A. (1996). Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinine. *Trends in neurosciences*, 19(11), 514–520. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10058-8](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10058-8)

Liang, C. S., Fan, T. H., Sullebarger, J. T., & Sakamoto, S. (1989). Decreased adrenergic neuronal uptake activity in experimental right heart failure. A chamber-specific contributor to beta-adrenoceptor downregulation. *The Journal of clinical investigation*, 84(4), 1267–1275. <https://doi.org/10.1172/JCI114294>

M Ito and D P Zipes. (1994). Efferent sympathetic and vagal innervation of the canine right ventricle. *Sep* <https://doi.org/10.1161/01.CIR.90.3.1459> *Circulation*. 1994; 90:1459–1468

M. Gagliardi, W. C. Randall, D. Bieger, R. D. Wurster, D. A. Hopkins, and J. A. Armour. (1988). Activity of in vivo canine cardiac plexus neurons. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 255: 4, H789-H800.

Maarman, G., Lecour, S., Butrous, G., Thienemann, F., & Sliwa, K. (2013). A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulmonary circulation*, 3(4), 739–756. <https://doi.org/10.1086/674770>

Machado, C. R., Camargos, E. R., Guerra, L. B., & Moreira, M. C. (2000). Cardiac autonomic denervation in congestive heart failure: comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. *Human pathology*, 31(1), 3–10. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(00\)80191-4](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(00)80191-4)

Miguel Ángel Imizcoz. (2008). Insuficiencia cardíaca. Definición, fisiopatología y cambios estructurales. Heart failure. Definition, pathophysiology and structural changes. Servicio de Cardiología Hospital de Navarra. Pamplona.

- Mühlfeld, C., Coulibaly, M., Dörge, H., Sellin, C., Liakopoulos, O., Ballat, C., Richter, J., & Schoendube, F. (2004). Ultrastructure of right ventricular myocardium subjected to acute pressure load. *The Thoracic and cardiovascular surgeon*, 52(6), 328–333. <https://doi.org/10.1055/s-2004-821272>
- Mühlfeld, C., Papadakis, T., Krasteva, G., Nyengaard, J. R., Hahn, U., & Kummer, W. (2010). An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. :1985), 108(5), 1402–1409. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01013.2009>
- Mühlfeld, C., Schipke, J., Schmidt, A., Post, H., Pieske, B. and Sedej, S. (2013), Hypoinnervation is an early event in experimental myocardial remodelling induced by pressure overload. *J. Anat.*, 222: 634–644. doi:10.1111/joa.12044
- Niu, X., Watts, V. L., Cingolani, O. H., Sivakumaran, V., Leyton-Mange, J. S., Ellis, C. L., Miller, K. L., Vandegaer, K., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Paolocci, N., Kass, D. A., & Barouch, L. A. (2012). Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(22), 1979–1987. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.12.046>
- Nogueira-Ferreira, R., Vitorino, R., Ferreira, R., & Henriques-Coelho, T. (2015). Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 35, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.09.007>
- Okumura, K., Kato, H., Honjo, O., Breitling, S., Kuebler, W. M., Sun, M., & Friedberg, M. K. (2015). Carvedilol improves biventricular fibrosis and function in experimental pulmonary hypertension. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 93(6), 663–674. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1251-9>
- Olshansky, B., Sabbah, H. N., Hauptman, P. J., & Colucci, W. S. (2008). Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation*, 118(8), 863–871.
- Oscar H L Bing. (1994). Hypothesis: Apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload. *J Mol Cell Cardiology*.
- Palaniyandi, S. S., Qi, X., Yogalingam, G., Ferreira, J. C., & Mochly-Rosen, D. (2010). Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure. *Drug discovery today. Disease mechanisms*, 7(2), e95–e102. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2010.07.002>
- Parsons, R.L., Locknar, S.A., Young, B.A. et al. (2006). Presence and co-localization of vasoactive intestinal polypeptide with neuronal nitric oxide synthase in cells and nerve fibers within guinea pig intrinsic cardiac ganglia and cardiac tissue. *Cell Tissue Res* 323, 197–209. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0074-3>
- Patel, V. B., Zhong, J. C., Grant, M. B., & Oudit, G. Y. (2016). Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. *Circulation research*, 118(8), 1313–1326. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307708>.
- Pauziene, N., Alaburda, P., Rysevaite-Kyguoliene, K., Pauza, A. G., Inokaitis, H., Masaityte, A., Rudokaite, G., Saburkina, I., Plisiene, J., & Pauza, D. H. (2016). Innervation of the rabbit cardiac ventricles. *Journal of anatomy*, 228(1), 26–46. <https://doi.org/10.1111/joa.12400>
- Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Dunn, F. G., Nishiyama, K., Tsuchiya, M., & Frohlich, E. D. (1979). Natural biventricular hypertrophy in normotensive rats. I. Physical and hemodynamic characteristics. *The American journal of physiology*, 236(4), H640–H643. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1979.236.4.H640>
- Piao, L., Marsboom, G., & Archer, S. L. (2010). Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 88(10), 1011–1020. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0679-1>
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. (2001). *Autonomic Regulation of Cardiovascular Function Neuroscience*. 2nd edition.
- Rastaldo, R., Pagliaro, P., Cappello, S., Penna, C., Mancardi, D., Westerhof, N., & Losano, G. (2007). Nitric oxide and cardiac function. *Life sciences*, 81(10), 779–793. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.07.019>

- Ritter, O., & Neyses, L. (2003). The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends in molecular medicine*, 9(7), 313–321. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(03\)00114-x](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(03)00114-x)
- Robert J Tomanek, Mary T Whitaker, Compensated function in hypertrophied ventricles of Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. (1990). *Cardiovascular Research*, Volume 24, Issue 3, March, Pages 204–209.
- Robert Naeije, Roberto Badagliacca, (2017). The overloaded right heart and ventricular interdependence, *Cardiovascular Research*, Volume 113, Issue 12, October, Pages 1474–1485.
- Robert Naeije, Roberto Badagliacca. (2017). The overloaded right heart and ventricular interdependence, *Cardiovascular Research*, Volume 113, Issue 12, October, Pages 1474–1485, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx160>
- Roeder, E., & Wiedenfeld, H. (2013). Plants containing pyrrolizidine alkaloids used in the traditional Indian medicine--including ayurveda. *Die Pharmazie*, 68(2), 83–92.
- Rosoklija G, Mancevski B, Ilijevski B, Perera T, Lisanby SH, Coplan JD, et al. Optimization of Golgi methods for impregnation of brain tissue from human and monkeys. *J Neurosci Methods* 2003; 131:1–7.
- Rutenberg, H. L., & Spann, J. F., Jr (1973). Alterations of cardiac sympathetic neurotransmitter activity in congestive heart failure. *The American journal of cardiology*, 32(4), 472–480. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(73\)80038-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(73)80038-4)
- Rysevaite, K., Saburkina, I., Pauziene, N., Noujaim, S. F., Jalife, J., & Pauza, D. H. (2011). Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. *Heart rhythm*, 8(3), 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2010.11.019>
- Santos-Ribeiro, D., Mendes-Ferreira, P., Maia-Rocha, C., Adão, R., Leite-Moreira, A. F., & Brás-Silva, C. (2016). Pulmonary arterial hypertension: Basic knowledge for clinicians. *Archives of cardiovascular diseases*, 109(10), 550–561. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2016.03.004>
- Sanyal, Shamarendra & Wada, Tomoyuki & Yamabe, Motoko & Anai, Hirofumi & Miyamoto, Shinji & Shimada, Tatsuo & Ono, Katsushige. (2012). Cardiac autonomic nerve abnormalities in chronic heart failure are associated with presynaptic vagal nerve degeneration. *Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*. 19. [10.1016/j.pathophys.2012.07.004](https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2012.07.004).
- Savarese, G., & Lund, L. H. (2017). Global public health burden of heart failure. *Cardiac failure review*, 3(1), 7.
- Savinova, O. V., & Gerdes, A. M. (2012). Myocyte changes in heart failure. *Heart failure clinics*, 8(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2011.08.004>.
- Schermuly, R. T., Kreisselmeier, K. P., Ghofrani, H. A., Yilmaz, H., Butrous, G., Ermert, L., Ermert, M., Weissmann, N., Rose, F., Guenther, A., Walmrath, D., Seeger, W., & Grimminger, F. (2004). Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 169(1), 39–45. <https://doi.org/10.1164/rccm.200302-282OC>
- Sears, C. E., Ashley, E. A., & Casadei, B. (2004). Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359(1446), 1021–1044. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1477>
- Sebkhi, A., Zhao, L., Lu, L., Haley, C. S., Nunez, D. J., & Wilkins, M. R. (1999). Genetic determination of cardiac mass in normotensive rats: results from an F344xWKY cross. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 33(4), 949–953. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.33.4.949>
- Sengupta, P. P., & Narula, J. (2013). RV form and function: a piston pump, vortex impeller, or hydraulic ram? *JACC. Cardiovascular imaging*, 6(5), 636–639. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2013.04.003>

- Seta, Y., Shan, K., Bozkurt, B., Oral, H., & Mann, D. L. (1996). Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *Journal of cardiac failure*, 2(3), 243–249. [https://doi.org/10.1016/s1071-9164\(96\)80047-9](https://doi.org/10.1016/s1071-9164(96)80047-9)
- Shah, A. M., & MacCarthy, P. A. (2000). Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacology & therapeutics*, 86(1), 49–86. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(99\)00072-8](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(99)00072-8)
- Sharma, R., Coats, A. J., & Anker, S. D. (2000). The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. *International journal of cardiology*, 72(2), 175–186. [https://doi.org/10.1016/s0167-5273\(99\)00186-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5273(99)00186-2)
- Shenton, FC, Campbell, T, Jones, JFX, Pyner, S. (2020). Distribution and morphology of sensory and autonomic fibres in the subendocardial plexus of the rat heart. *J. Ana. ; 00*: 1– 17.
- Singh, S., Johnson, P. I., Lee, R. E., Orfei, E., Lonchyna, V. A., Sullivan, H. J., Montoya, A., Tran, H., Wehrmacher, W. H., & Wurster, R. D. (1996). Topography of cardiac ganglia in the adult human heart. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 112(4), 943–953. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(96\)70094-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(96)70094-6)
- Singh, S., Sayers, S., Walter, J. S., Thomas, D., Dieter, R. S., Nee, L. M., & Wurster, R. D. (2013). Hypertrophy of neurons within cardiac ganglia in human, canine, and rat heart failure: the potential role of nerve growth factor. *Journal of the American Heart Association*, 2(4), e000210. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000210>.
- Sydykov, A., Mamazhakypov, A., Petrovic, A., Kosanovic, D., Sarybaev, A. S., Weissmann, N., Ghofrani, H. A., & Schermuly, R. T. (2018). Inflammatory Mediators Drive Adverse Right Ventricular Remodeling and Dysfunction and Serve as Potential Biomarkers. *Frontiers in physiology*, 9, 609. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00609>
- Unger, T., & Li, J. (2004). The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*, 5 Suppl 1, S7–S10. <https://doi.org/10.3317/jraas.2004.024>
- V. Regitz, B. Leuchs, C. Bossaller, J. Sehested, M. Rappolder, E. Fleck. (1991). Myocardial catecholamine concentrations in dilated cardiomyopathy and heart failure of different origins, *European Heart Journal*, Volume 12, Issue suppl\_D, 1 August, Pages 171–174.
- Vaillancourt, M., Chia, P., Sarji, S. et al. (2017). Autonomic nervous system involvement in pulmonary arterial hypertension. *Respir Res* 18, 201 <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0679-6>
- Vejlstrup, N. G., Bouloumie, A., Boesgaard, S., Andersen, C. B., Nielsen-Kudsk, J. E., Mortensen, S. A., Kent, J. D., Harrison, D. G., Busse, R., & Aldershvile, J. (1998). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 30(6), 1215–1223. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0686>
- Véronique L. Roger. (2013). Epidemiology of Heart Failure. *Circulation Research*. 2013; 113:646–659.
- Volume 17, Issue 3, 1 May, Pages 339-340
- Voss G, Sachsse K. Red cell and plasma cholinesterase activities in microsamples of human and animal blood determined simultaneously by a modified acetylthiocholine-DTNB procedure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1970 May; 16 (3):764-72. doi: 10.1016/0041-008x(70)90082-7. PMID: 5422218.
- Wake, E., & Brack, K. (2016). Characterization of the intrinsic cardiac nervous system. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 199, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.08.006>
- Wang, Joy & Rai, Rabjot & Carrasco, Mark & Sam-Odusina, Tiwadayo & Salandy, Sonja & Gielecki, Jerzy & Zurada, Anna & Loukas, Marios. (2019). an Anatomical Review of the Right Ventricle. *Translational Research in Anatomy*. 17. 100049. 10.1016/j.tria.2019.100049.
- Wilson, D. W., Segall, H. J., Pan, L. C., Lamé, M. W., Estep, J. E., & Morin, D. (1992). Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Critical reviews in toxicology*, 22(5-6), 307–325. <https://doi.org/10.3109/10408449209146311>
- Wojtarowicz, A., Podlasz, P., & Czaja, K. (2003). Adrenergic and cholinergic innervation of pulmonary tissue in the pig. *Folia morphologica*, 62(3), 215–218.

- Woodall, M. C., Ciccarelli, M., Woodall, B. P., & Koch, W. J. (2014). G protein-coupled receptor kinase 2: a link between myocardial contractile function and cardiac metabolism. *Circulation research*, 114(10), 1661–1670. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300513>
- Xie, H., Orkin, S. (2007). Changed destiny. *Nature* 449, 410–411.
- Xing, J., Lu, J., & Li, J. (2014). Nerve Growth Factor Decreases in Sympathetic and Sensory Nerves of Rats with Chronic Heart Failure. *Neurochemical Research*, 39(8).
- Xu, X. L., Zang, W. J., Lu, J., Kang, X. Q., Li, M., & Yu, X. J. (2006). Effects of carvedilol on M2 receptors and cholinesterase-positive nerves in adriamycin-induced rat failing heart. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 130(1-2), 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.04.005>
- Xu-Cai YO, Wu Q. (2010). Molecular forms of natriuretic peptides in heart failure and their implications. *Heart*; 96:419-424.
- Yamada, Y., Okumura, K., Hashimoto, H., Ito, T., & Satake, T. (1991). Altered myocardial acetylcholine and norepinephrine concentrations in right ventricular hypertrophy and failure. *Heart and vessels*, 6(3), 150–157. <https://doi.org/10.1007/BF02058280>
- Yancy, C. W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D. E., Jr, Drazner, M. H., Fonarow, G. C., Geraci, S. A., Horwich, T., Januzzi, J. L., Johnson, M. R., Kasper, E. K., Levy, W. C., Masoudi, F. A., McBride, P. E., McMurray, J. J., Mitchell, J. E., Peterson, P. N., Riegel, B., Sam, F., ... Wilkoff, B. L. (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*, 128(16), 1810–1852.
- Yin, J., You, S., Liu, H., Chen, L., Zhang, C., Hu, H., Xue, M., Cheng, W., Wang, Y., Li, X., Shi, Y., Li, N., Yan, S., & Li, X. (2017). Role of P2X<sub>7</sub>R in the development and progression of pulmonary hypertension. *Respiratory research*, 18(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0603-0>
- Zhang, D. Y., & Anderson, A. S. (2014). The sympathetic nervous system and heart failure. *Cardiology clinics*, 32(1), 33–vii. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2013.09.010>
- Zhang, Y. H., Jin, C. Z., Jang, J. H., & Wang, Y. (2014). Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology. *The Journal of physiology*, 592(15), 3189–3200. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.270306>