



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, PEDIATRIA Y RADIOLOGIA

TESIS DOCTORAL

“INMUNOLocalización DE LA SUSTANCIA P Y DEL RECEPTOR NK1 EN EL CORAZÓN HUMANO DESDE LA VIDA FETAL A LA ADULTA”

Ana Méndez Santos

Sevilla, 2017

DR. D. MIGUEL MUÑOZ SÁEZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA

CERTIFICA:

Que bajo su dirección la Licenciada en Medicina y Cirugía, Dña Ana Méndez Santos, ha realizado el trabajo titulado **“INMUNOLocalIZACIÓN DE LA SUSTANCIA P Y DEL RECEPTOR NK1 EN EL CORAZÓN HUMANO DESDE LA VIDA FETAL A LA ADULTA”**

El trabajo reúne todas las características exigibles desde el punto legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 26 de Junio de 2017



Fdo: Dr. D. Miguel Muñoz Sáez

**DR. D. FRANCISCO MURILLO CABEZAS, CATEDRÁTICO DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

C E R T I F I C A :

Que bajo su tutorización la Licenciada en Medicina D^a. Ana Méndez Santos, ha realizado el trabajo titulado **“INMUNOLocalización DE LA SUSTANCIA P Y DEL RECEPTOR NK1 EN EL CORAZÓN HUMANO DESDE LA VIDA FETAL A LA ADULTA”**

El trabajo reúne todas las características exigibles desde el punto legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 26 de junio de 2017



Fdo: Dr. D. Francisco Murillo Cabezas

**DÑA ANA MÉNDEZ SANTOS, LICENCIADA EN MEDICINA POR LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

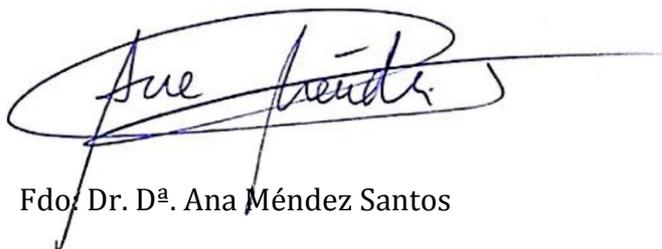
CERTIFICA:

Que es la autora del trabajo titulado **“INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA
SUSTANCIA P Y DEL RECEPTOR NK1 EN EL CORAZÓN HUMANO DESDE LA
VIDA FETAL A LA ADULTA”**

Este trabajo ha sido dirigido por D. Miguel Muñoz Sáez, doctor en Medicina y Cirugía y tutorizado por D. Juan Carlos Crespo de la Rosa y D. Francisco Murillo Cabezas, profesores asociados del departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firmo la presente certificación.

Sevilla, 26 de Junio de 2017



Fdo. Dr. D^a. Ana Méndez Santos

AGRADECMIENTOS

Quiero empezar mi agradecimiento dedicándole un recuerdo especial al Dr. Santos de Soto, que me introdujo y transmitió el amor por los niños y la cardiología. Mi admiración y cariño perdurarán siempre.

Al Dr D. Miguel Muñoz Sáez por ser mi maestro y mostrarme el amor por la investigación, la ciencia y la verdad. Además de todo esto, por enseñarme una sabiduría y actitud frente a la vida genuina que no viene en los libros. Recordaré siempre los detalles, las acciones y las conversaciones con las que me ha ido forjando durante todo este camino.

A Carolina y Fernando del Biobanco del Hospital, por mostrarse siempre disponibles a pesar de las horas intempestivas en las que le solicitaba ayuda. Gracias por ayudarme en cada una de las etapas.

No puedo olvidar a cada una de las personas del Departamento de Anatomía Patológica. La actitud de servicio y profesionalidad con la que siempre me han tratado han contribuido en gran parte a este trabajo.

A Manuel Salguero, del Servicio de Histopatología del Instituto Forense por ayudarme a aprender tantas cosas en tan poco tiempo, transmitiéndome además la importancia de la rigurosidad y dedicación a su trabajo.

A mi amigo Javi por ayudarme a culminar esta tesis de la única forma que sabe: con el trabajo bien hecho y con el cuidado de los pequeños detalles.

Por último, quiero finalizar agradeciendo a cada uno de mis compañeros del Hospital Saint-Justine de Montreal (Canada). Siempre creyeron en mí y me dieron todas las ayudas posibles para poder finalizar este proyecto. Les debo mi modo de trabajar y el no darme por vencida ante ningún desafío intelectual ni personal.

*“Busquemos con afán de encontrar
y encontremos con el deseo de buscar aún más”*

San Agustín

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AMPc	adenosín monofosfato ciclico
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMP _c	Adenosín monofosfato cíclico
CD	Células dendríticas
CMH	Células madres hematopoyéticas
EC	Electroforesis capilar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzimoinmunoanálisis
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis murina
GABA	Acido gamma-aminobutírico
GH	Hormona del crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de GH
GPCRs	Proteínas G acoplados a receptores
hCT	Tirotropina coriónica humana
HK-I	Hemokinina-I
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IL-1, IL-2, IL-6 y IL-8	Interleuquinas 1, 2, 6 y 8
KDa	Kilodalton
MAPKS	Protein quinasa activada por mitógenos
mM	milimolar
ms	milisegundo
MSH	Hormona estimulante de los melanocitos
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
NF-kB	Factor de necrosis kB
NGF	Factor de crecimiento nervioso

NK1	Neurokinina 1
NKA	Neurokinina A
NKB	Neurokinina B
nM	Nanomolar
NP	Neuropéptido
NPK	Neuropéptido K
NPy	Neuropéptido gamma
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHI	Hormona inhibidora de prolactina
pmol	picomol
PPT I ó PPT-A	Gen Preprotaquicinina I
PPT II ó PPT-B	Gen Preprotaquicinina II-B
PTT III ó PPT-C	Gen Preprotaquicinina III-C
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TK	Taquicinas
RIA	Radioinmunoanálisis
RR	Riesgo relativo
RNK1	Receptor neurokinina 1
RNK2	Receptor neurokinina 2
RNK3	Receptor neurokinina 3
SI	Sistema Inmune
SP	Sustancia P
TACR1	Gen del receptor de las taquicinas 1
TACR2	Gen del receptor de las taquicinas 2
TACR3	Gen del receptor de las taquicinas 3
TK	Taquicinas
TNFa	Factor de necrosis tumoral a
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

ÍNDICE ABREVIADO

	PÁG.
I. INTRODUCCIÓN	20
II. OBJETIVOS	143
III. MATERIAL Y MÉTODOS	146
IV. RESULTADOS	157
V. DISCUSIÓN	182
VI. RESUMEN	199
VII. CONCLUSIONES	203
VIII. ANEXO	205
IX. BIBLIOGRAFÍA	219

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

2. APARATO CARDIOVASCULAR: DESARROLLO EMBRIONARIO Y ANATOMÍA CARDIACA

2.1 GENERALIDADES DEL APARATO CARDIOVASCULAR

2.2 DESARROLLO EMBRIONARIO

2.3 ANATOMÍA: Estructura del corazón

- Pared cardiaca
- Esqueleto fibroso
- Cavidades cardiacas
- Válvulas cardiacas
- Sistema de conducción del corazón
- Grandes vasos
- Irrigación del corazón: circulación coronaria
- Inervación cardiaca

3. SISTEMA NERVIOSO Y COMUNICACIÓN NEURONAL

3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

3.2 ELEMENTOS DE LA COMUNICACIÓN NEURONAL

3.2.1 Neurotransmisor, neuromodulador, neurohormona

3.2.2 Neuropeptidos

3.2.3 Receptores

3.2.4 Sinapsis y efectos postsinápticos. Coexistencia de péptidos con neurotransmisores clásicos

4. LA GRAN FAMILIA DE LAS TAQUICININAS
 - 4.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS: Descubrimiento de la SP
 - 4.2 PÉPTIDOS DE LA FAMILIA DE LAS TAQUICININAS Y ESTRUCTURA GENÉTICA
 - 4.3 RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS: Estructura genética y tipos
 - 4.4 DISTRIBUCIÓN DE LAS TAQUICININAS Y SUS RECEPTORES

5. SUSTANCIA P Y RECEPTOR NK-1
 - 5.1 RECEPTOR NK-1
 - 5.1.1 Señalización mediada por GPCRs
 - 5.1.2 Isoformas, glicosilación y clasificación
 - 5.1.3 Agonistas y antagonistas
 - 5.2 SUSTANCIA P
 - 5.2.1 Distribución y acciones fisiológicas
 - 5.2.2 Patologías relacionadas con la SP

II. OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MÉTODO DE TRABAJO
 - 1.1 Diseño del estudio
 - 1.2 Población de estudio y tamaño muestral
 - 1.3 Número de muestras y definición de zonas a estudiar
 - 1.4 Aspectos éticos de la investigación

2. MATERIAL DE ESTUDIO Y TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA
 - 2.1 Material biológico: anticuerpos y tejido cardiaco
 - 2.2 Material fungible e inventariable: procesamiento de muestras y descripción de inmunohistoquímica indirecta
 - 2.3 Valoración e interpretación de los resultados

IV. RESULTADOS

1. Descripción de la serie de casos y definición de las zonas estudiadas
2. Tinción con hematoxilina-eosina
3. Expresión y distribución inmunohistoquímica de la SP
4. Expresión y distribución inmunohistoquímica del NK1R
5. Control negativo
6. Resumen de los resultados

V. DISCUSIÓN

VI. RESUMEN

VII. CONCLUSIONES

VIII. ANEXOS

IX. BIBLIOGRAFÍA

FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1: Diagrama ilustrativo de la circulación en serie.

Figura 2: Ilustración de la circulación fetal en paralelo con la posición estratégica del istmo aortico.

Figura 3: Reproducción de un dibujo de Leonardo da Vinci que muestra un feto dentro de un útero incidido.

Figura 4: Esquema temporal lineal de la cardiogénesis humana.

Figura 5: Ilustración de la cardiogénesis humana.

Figura 6: Tabicación auricular.

Figura 7: Formación del tabique conotruncal.

Figura 8: Imagen macroscópica del corazón en un feto humano.

Figura 9: Cara anterior del corazón.

Figura 10: Cara basal y diafragmática del corazón.

Figura 11: Microfotografía del epicardio.

Figura 12: Miocardio y discos intercalares.

Figura 13: Músculo estriado esquelético y cardiaco.

Figura 14: Estructura simplificada del sarcómero.

Figura 15: Ilustración representativa de la contracción muscular.

Figura 16: Microfotografía de miocitos auriculares y ventriculares.

Figura 17: Corte transversal de la pared cardiaca humana: Endocardio.

Figura 18: Microfotografía de la pared del ventrículo derecho humano.

Figura 19: Esqueleto fibroso del corazón.

Figura 20: Ilustración de la aurícula derecha.

Figura 21: Ilustración del ventrículo derecho.

Figura 22: Microfotografía de la válvula mitral en un corte transversal.

Figura 23: Ilustración de la válvula aórtica.

Figura 24: Nodo sinoauricular, macroscopía.

Figura 25: Nodo sinoauricular, secciones histológicas.

Figura 26: Nodo auriculoventricular.

Figura 27: Diagrama esquemático de las características de los vasos sanguíneos.

Figura 28: Arteria elástica, secciones histológicas.

Figura 29: Arteria muscular, secciones histológicas.

Figura 30: Corte transversal de una arteria elástica y una arteria muscular.

Figura 31: Vascularización del corazón.

Figura 32: Drenaje venoso del corazón.

Figura 33: Regulación autonómica del corazón.

Figura 34: Ilustración del plexo cardiaco.

Figura 35: Modelo ilustrativo de la jerarquía neuronal cardiaca.

Figura 36: Dibujos originales de diferentes estructuras del SNC realizados por Ramón y Cajal.

Figura 37: Representación esquemática de una sinapsis eléctrica.

Figura 38: Representación esquemática de una sinapsis química.

Figura 39: Ilustración representativa del experimento de Otto Loewi.

Figura 40: Representación esquemática de la síntesis y liberación de neuropéptidos y neurotransmisores.

Figura 41: Receptor ionotrópico.

Figura 42: Receptor acoplado a proteína G.

Figura 43: Ilustración de la proteína G con sus diferentes isoformas.

Figura 44: Activación e inactivación del receptor acoplado a proteína G.

Figura 45: Vías efectoras de los receptores acoplados a proteína G.

Figura 46: Ilustración que muestra la coexistencia de péptidos con neurotransmisores clásicos.

Figura 47: Retrato de Ulf Von Euler.

Figura 48: Retrato de Susan E. Leeman.

Figura 49: Genes TAC1 y TAC3 mostrando la organización de los exones y las posiciones de los diferentes péptidos.

Figura 50: Esquema del proceso de síntesis neuronal de las taquicininas.

Figura 51: Representación esquemática de la estructura del receptor NK1.

Figura 52: Esquema de los genes que codifican los receptores taquicinérgicos.

Figura 53: Modelo de activación del NK1R.

Figura 54: Representación esquemática de las vías de señalización intracelular tras la activación del NK1R por la SP

Figura 55: Mecanismos de activación del receptor NK1

Figura 56: Esquema del efecto proliferativo y anti-apoptótico de la SP a través de la β -arrestina

Figura 57: Internalización de NK1R tras un estímulo somatosensorial.

Figura 58: Mecanismos de desensibilización y resensibilización del NK1R

Figura 59: Esquema modelo del receptor NK-1 en su isoforma completa e isoforma truncada.

Figura 60: Representación de los subtipos de receptores NK1 con las taquicinas endógenas por las que muestran mayor afinidad.

Figura 61: Aprepitant y sus sitios de unión al receptor NK1

Figura 62: Estructura química de los antagonistas no peptídicos del NK1R:

Figura 63: Sustancia P: secuencia de aminoácidos

Figura 64: Representación esquemática de los sitios de unión de la SP y CP-96,345 en el NK1

Figura 65: Regulación de la hematopoyesis por parte de la SP

Figura 66: Resumen de las acciones hematopoyéticas de la SP y NK-A.

Figura 67: Implicaciones del sistema SP/NK1R en patología humana

Figura 68: Microfotografía de tejido cardíaco: miocardio de ventrículo derecho

Figura 69: Microfotografía de tejido cardíaco: miocardio de ventrículo izquierdo

Figura 70: Microfotografía de tejido cardíaco auricular.

Figura 71: Microfotografía de tejido de conducción cardíaco de corazón adulto.

Figura 72: Microfotografía de tejido de conducción cardíaco de neonato

Figura 73: Microfotografía de arteria coronaria de neonato

Figura 74: Expresión inmunohistoquímica de SP en miocardio de aurícula derecha de corazón adulto.

Figura 75: Expresión inmunohistoquímica de SP en el miocardio de la aurícula derecha.

Figura 76: Expresión inmunohistoquímica de SP en el miocardio de ventrículo derecho

Figura 77: Expresión inmunohistoquímica de SP en el miocardio de la aurícula izquierda

Figura 78: Expresión inmunohistoquímica de SP en el miocardio de ventrículo izquierdo

Figura 79: Expresión inmunohistoquímica de SP en el epicardio.

Figura 80: Expresión inmunohistoquímica de SP en células del nodo sinusal de corazón adulto

Figura 81: Expresión inmunohistoquímica de SP en células nodo AV de corazón de neonato

Figura 82: Expresión inmunohistoquímica de SP en arteria coronaria de corazón adulto

Figura 83: Expresión inmunohistoquímica de SP en arteria coronaria fetal.

Figuro 84: Expresión inmunohistoquímica de SP en tejido valvular mitral.

Figura 85: Expresión inmunohistoquímica de SP en arteria aorta

Figura 86: Inmunorreactividad de NK1R en miocardio de aurícula derecha.

Figura 87: Inmunorreactividad de NK1R en miocardio de ventrículo derecho

Figura 88: Inmunorreactividad de NK1R en miocardio de aurícula y ventrículo izquierdo.

Figura 89: Inmunorreactividad de NK1R en miocitos del nodo sinoauricular de corazón adulto

Figura 90: Inmunorreactividad de NK1R en miocitos del nodo auriculoventricular de neonato

Figura 91: Inmunorreactividad de NK1R en arterias coronarias.

Figura 92: Inmunorreactividad de NK1R en valva mitral de neonato

Figura 93: Inmunorreactividad de NK1R en pared aórtica

Figura 94: Control negativo

TABLAS

Tabla 1: Neurotransmisores clásicos o de acción rápida.

Tabla 2: Características y diferencias entre neurotransmisores y neuropéptidos.

Tabla 3: Secuencia de aminoácidos de las fundamentales taquicininas humanas

Tabla 4: Receptores taquicinérgicos

Tabla 5: Secuencia de aminoácidos de las TK y su afinidad por los receptores

Tabla 6: NK1R y NK1R truncado: características diferenciales

Tabla 7: Estructura y nombre de los principales antagonistas peptídicos del receptor NK1

Tabla 8: Indicaciones y usos clínicos de algunos antagonistas de NK1R

Tabla 9: Distribución de la serie de casos

Tabla 10: Resumen de la valoración inmunohistoquímica de las muestras de tejido cardiaco humano fetal, neonatal y adulto.

Tabla 11: Localización de la SP en el corazón de diferentes especies.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

La *Cardiología* es uno de los campos de la Medicina que más avances ha experimentado en los últimos años. Sin embargo, a pesar de las mejoras en el tratamiento y pronóstico, aún se desconocen los mecanismos íntimos que conducen al desarrollo de diversas patologías cardíacas y a la aparición de las cardiopatías congénitas. La existencia de estas incógnitas lleva a la búsqueda de un conocimiento más profundo de los mecanismos subyacentes de la enfermedad. Esto podría, no sólo mejorar la comprensión, sino también el tratamiento específico, el pronóstico y la evolución de estas patologías.

En las últimas décadas, el progreso de la Biología Molecular ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias tanto diagnósticas como terapéuticas. Así, tras el descubrimiento de los Sistemas peptidérgicos y la identificación de diversos neuropéptidos como la sustancia P (SP), se ha desarrollado un nuevo paradigma en la terapia farmacológica que podría dar explicaciones a muchos interrogantes actuales y cambiar el rumbo de la Medicina actual.

Clásicamente, se ha considerado que el corazón posee una inervación extrínseca formada por neuronas simpáticas y parasimpáticas de naturaleza tanto eferente como aferente. Además, estos nervios extrínsecos estarían interconectados con neuronas existentes en los ganglios intracardiacos, los cuales serían los responsables de regular la actividad cardíaca intrínseca. Con el descubrimiento, aislamiento y caracterización estructural de un gran número de neuropéptidos en el corazón (SP, péptido intestinal vasoactivo, neurotensina, neuropéptido Y, encefalina) este concepto clásico se ha modificado. El control nervioso del corazón es más complejo que el clásico control doble (adrenérgico y colinérgico) y la inervación peptidérgica cardíaca parece desempeñar un papel fundamental.

Se necesita, por tanto, un enorme esfuerzo para ampliar la visión actual y buscar las causas más profundas de las enfermedades cardíacas.

2. APARATO CARDIOVASCULAR: DESARROLLO EMBRIONARIO Y ANATOMÍA CARDIACA

2.1 GENERALIDADES DEL APARATO CARDIOVASCULAR

El corazón es el órgano principal del aparato circulatorio que funciona como una bomba impulsando la sangre y proporcionando a los tejidos el suministro continuo de nutrientes vitales necesarios para sobrevivir. Mientras los seres unicelulares intercambian el oxígeno y los productos metabólicos por simple proceso de difusión con el medio, los organismos superiores han de desarrollar un sistema circulatorio que proporcione un flujo continuo de sangre a todas las células. El aparato circulatorio consta de una bomba de impulsión, el corazón; un sistema aferente, las arterias; otro eferente, las venas; y un sistema de intercambio, la red capilar. Funcionalmente, el corazón y los vasos sanguíneos constituyen, en la etapa postnatal, dos vías de circulación colocadas en serie (Figura 1) para formar un circuito continuo:

- La circulación pulmonar o menor; representada por los pulmones y el denominado corazón derecho.
- La circulación sistémica o mayor; representada por el corazón izquierdo y el resto de órganos sistémicos.

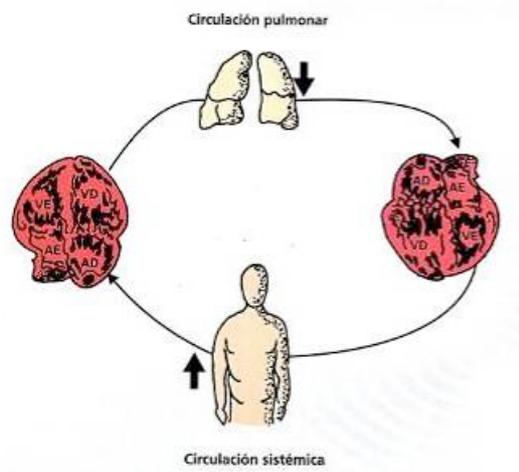


Figura 1. Diagrama ilustrativo de la circulación en serie. (Imagen tomada de Zielinsky 2009)

En el corazón fetal, los ventrículos trabajan paralelamente y no en serie, con volúmenes de eyección independientes (Figura 2). Así las cavidades derechas irrigan la parte inferior del cuerpo y las cavidades izquierdas la mitad superior del cuerpo con sangre con mayor proporción de oxígeno. El istmo aórtico, localizado entre la arteria subclavia izquierda y la desembocadura del ductus arterioso, tiene una posición estratégica al ser el único segmento que comunica estas dos circulaciones dispuestas en paralelo convirtiéndose así en el único *shunt* arterial durante la vida fetal.



Figura 2: Esquema que muestra la posición estratégica del istmo aórtico entre las dos circulaciones durante la vida fetal. (Imagen tomada de Fouron 2003)

2.2 DESARROLLO EMBRIONARIO DEL CORAZÓN

La embriología es la rama de la biología que estudia las primeras etapas de la formación y desarrollo de los organismos. Comienza con la fecundación y a partir de ese momento se suceden una serie de cambios que se dividen en tres fases: segmentación, morfogénesis y diferenciación. En torno a la octava semana de desarrollo, cuando ya se han generado los principales órganos, el embrión pasa a denominarse feto.

La cardiogénesis o desarrollo del corazón embrionario, es un proceso secuencial, progresivo, ininterrumpido e irreversible que será dividida en dos etapas para su estudio: premorfogenética y morfogenética. La figura 4 muestra un esquema temporal lineal de la formación del corazón humano.



Figura 3: Reproducción de un dibujo de Leonardo da Vinci realizado en el siglo XV en el que se observa un feto dentro de un útero incidido. (Imagen tomada de Moore Keith 2009)

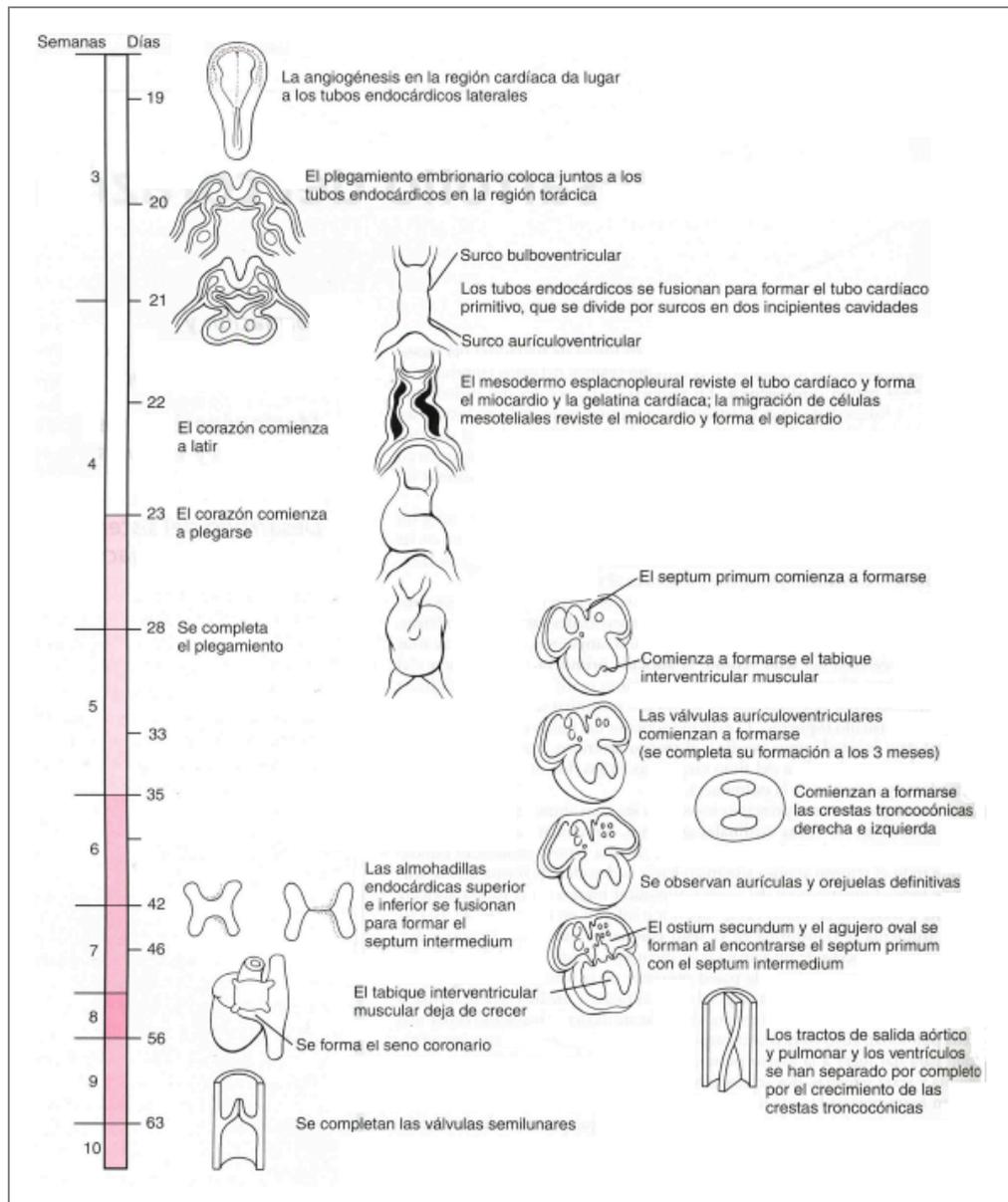


Figura 4. Esquema representativo de la formación del corazón humano de forma lineal y temporal. (Imagen tomada de Moore Keith 2009)

- Fase premorfológica

El sistema circulatorio es indispensable para sustentar la embriogénesis pues provee de nutrientes y oxígeno al organismo en desarrollo y elimina los productos de desechos y sustancias tóxicas. Esto determina que el corazón sea el único órgano que inicia su función en una etapa muy temprana de su morfogénesis, la cual se lleva a cabo en un período breve, que en humanos ocurre en la tercera semana de la gestación.

En el mesodermo se inician unos islotes angiogénicos que al unirse unos con otros irán formando los primeros vasos sanguíneos que establecen una circulación entre el corion y el embrión. En la fase premorfológica (Figura 5-A, 5-B, 5-C) no existe una estructura anatómica que identifique al corazón, sólo están presentes células que son determinadas para transformarse en miocardio. Se han detectado células con esta característica en la blástula del pollo, similar al embrión humano de 7 ± 1 día de gestación. En esta etapa se han descrito dos **preáreas cardiogénicas**, ubicadas en el epiblasto a cada lado de la línea primitiva cuyas células van a iniciar la especificación para transformarse en miocardio. Durante la gastrulación, las células precardiáticas migran a través de la línea primitiva hasta el mesodermo y forman las **áreas cardiogénicas** (15 ± 1 día). Son dos grupos celulares de forma oval que se encuentran uno a cada lado de la línea primitiva, a la altura del Nodo de Hensen. En este caso, las células ya están especificadas y determinadas para formar **miocardio y endocardio**. En la etapa de gástrula tardía (18 ± 1 día), las células cardiogénicas migran en sentido cefalomedial y dan origen a la **placa cardiogénica** que tiene la forma de herradura, ubicada en el extremo cefálico de la placa neural. Después (19 ± 1 día), el ectodermo y endodermo de la región cefálica del embrión, comienzan a doblarse y forman el pliegue cefálico que consta de la placa neural y el intestino portal anterior. Al mismo tiempo, el mesodermo se separa en dos capas, la somatopleura que permanece en contacto con el ectodermo y la esplacnopleura que se asocia al endodermo. En esta última capa se encuentran las células cardiogénicas, formando la placa cardiogénica que consta de un plexo de filamentos endoteliales, rodeados por una delgada capa de miocardio. Ambos tipos celulares son derivados del mesodermo precardiático y

expresan genes característicos de miocardio como los *Nkx 2.5* y *GATA4*. El día 21 ± 1 , el plexo mioendocárdico de la creciente cardiogénica se transforma en dos **primordios cardíacos primitivos**, cada uno constituido por un tubo de endocardio cubierto por miocardio, aún no existe epicardio. Inmediatamente, los primordios se desplazan en dirección ventromedial, se fusionan y constituyen el **tubo cardíaco primitivo o tubo cardíaco recto** (Figura 5-D), iniciando así la fase morfológica de la cardiogénesis.

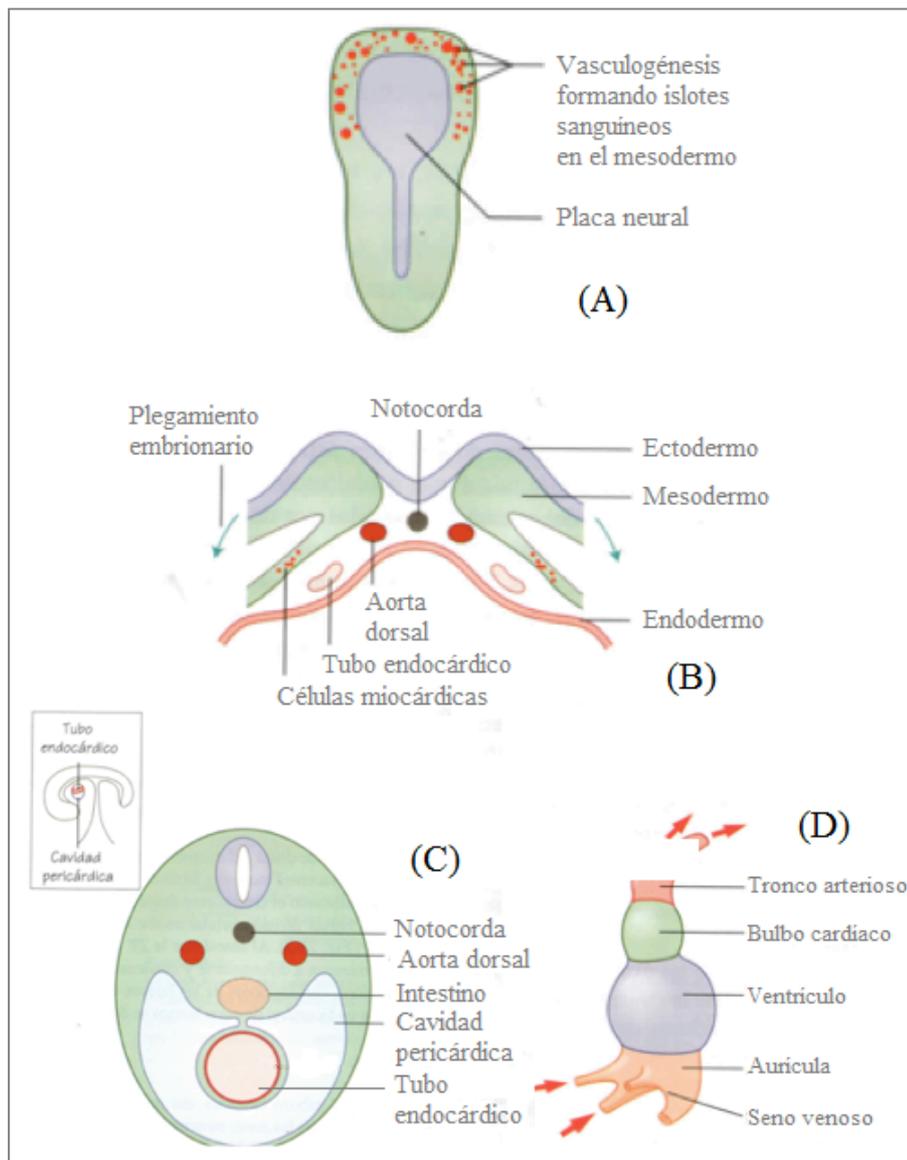


Figura 5. Representación de la cardiogénesis humana. A) Islotos sanguíneos en el mesodermo de la lámina lateral. B) Corte transversal de embrión en el que se observa la localización del tubo endocárdico y de las células miocárdicas antes de que éste comience a plegarse. C) Situación anterior del tubo endocárdico con respecto al intestino, en un corte transversal del embrión. D) Tubo cardíaco primitivo a 22 días de edad gestacional. Imagen tomada de (Webster Samuel 2013)

- Fase morfogénica

Esta fase se divide en tres periodos: A. Corazón en tubo recto. B) Proceso de torsión y rotación del tubo cardiaco. C) Inicio de la tabicación del corazón.

A. Corazón en tubo recto.

Clásicamente se ha señalado que en el corazón en tubo recto existen todas las cavidades que dan origen al órgano definitivo. Así Davis (Davis CL 1927) describió que el corazón en esta etapa estaba constituido por las siguientes cuatro **cavidades cardíacas primitivas** que darían lugar a otras estructuras:

1. **Bulbo aórtico** = arterias pulmonar y aorta,
2. **Bulbus cordis** = ventrículo derecho,
3. **Ventrículo primitivo** = ventrículo izquierdo
4. **Atrios primitivos** derecho e izquierdo= atrios definitivos

Más tarde Kramer (Kramer 1942) mencionó que el bulbus cordis constaba de dos primordios, el del ventrículo derecho y el de los tractos de salida ventriculares al que denominó **cono**. Sin embargo, mediante marcaje *in vivo* en el embrión del pollo, se encontró que el corazón se forma por la integración progresiva de seis segmentos cardíacos primitivos, que aparecen gradualmente y que cada uno de ellos origina una región anatómica específica de una cavidad cardíaca definitiva, y no a una cavidad completa como siempre se había enunciado. Así, por ejemplo, el hecho de que las tres regiones de los ventrículos (cámara de entrada, región trabeculada y cámara de salida) tengan características anatómicas bien definidas y se originen de un primordio propio, demuestra que los ventrículos son unidades anatómicas pero no embriológicas. (De La Cruz, Sanchez-Gomez et al. 1989), (Roger R. Markwald 1998)

Respecto a las características del corazón en tubo recto, describir sus dos segmentos: el cefálico que corresponde al primordio de la región trabeculada del ventrículo anatómicamente derecho y el segmento caudal que es el primordio de la región trabeculada del ventrículo anatómicamente izquierdo. Ambos segmentos están separados por dos surcos, denominados interventriculares derecho e izquierdo.

B. Proceso de torsión y rotación del tubo cardíaco.

Los segmentos cardíacos primitivos inicialmente están en serie y siguen una dirección caudocefálica, sin embargo como consecuencia del proceso de torsión y rotación del tubo cardíaco, adquieren la polaridad derecha-izquierda característica del órgano definitivo. Este proceso sucede en tres etapas: Asa en C, Asa en S y Asa avanzada. (Roger R. Markwald 1998)

B.1. Asa en C.

El corazón que al principio era un canal se vuelve un tubo. Al mismo tiempo, aumenta de tamaño por la incorporación de células en sus extremos caudal y cefálico. Se mantiene en el plano frontal, pero comienza a torcerse hacia la derecha, siendo ésta la primera manifestación de la asimetría del organismo. Así el corazón adquiere la forma de un asa con un borde derecho convexo (curvatura mayor) y un borde izquierdo cóncavo (curvatura menor). Simultáneamente, aparecen tres nuevos segmentos, dando como resultado un corazón constituido por cinco segmentos cardíacos primitivos, que en sentido caudo-cefálico son: los atrios primitivos derecho e izquierdo; el tracto de entrada primitivo (región caudal de la rama caudal del asa); el primordio de la región trabeculada del ventrículo izquierdo (región cefálica de la rama caudal del asa); el primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho (rama cefálica del asa) y el primordio de los tractos de salida (segmento proximal del tracto de salida embrionario, clásicamente llamado cono).

B.2. Asa en S.

El embrión empieza a flexionarse a nivel craneal y cervical, afectando la torsión y rotación del corazón (23 ± 1 día). Simultáneamente, el asa cardíaca se coloca en el plano sagital y toma la forma de S. La curvatura mayor se vuelve ventral y la menor dorsal; también aparece el seno venoso. En este caso, los primordios de las regiones trabeculadas ventriculares permanecen uno cefálico y otro caudal, pero el tracto de entrada y los atrios primitivos se vuelven ligeramente dorso-cefálicos. Respecto al segmento proximal del tracto de salida, prácticamente se ha completado y se mantiene en continuidad con la región trabeculada del ventrículo

derecho en desarrollo. Y es ahora cuando surge el órgano **proepicárdico**, que es un conjunto de células mesoteliales ubicadas sobre la superficie derecha del seno venoso, las cuales al migrar van cubriendo el miocardio de todo el corazón y más tarde se transforman en el **epicardio**. Algunas células penetran en las paredes ventriculares y el tabique interventricular en desarrollo y participan en la morfogénesis de las **arterias y venas coronarias**.

B.3. Asa avanzada.

En esta etapa (24 ± 1 día), los segmentos cardíacos primitivos ya ocupan la posición espacial y relaciones de vecindad que tienen en el corazón maduro. Termina de aparecer el segmento proximal del tracto de salida embrionario y empieza a formarse su segmento distal. La curvatura menor del asa prácticamente desapareció y comienza a desarrollarse el espolón conoventricular. Los atrios y el tracto de entrada primitivos toman una posición dorso-cefálica o postero-superior mientras que el primordio de la región trabeculada del ventrículo derecho y el segmento proximal del tracto de salida se ubican en posición ventro-derecha. Ambos segmentos del tracto de salida embrionario carecen de crestas en su interior y forman un solo conducto que permanece conectado con la región trabeculada del ventrículo derecho en desarrollo.

C. Inicio de la tabicación del corazón.

Comienza el día 29 ± 1 , una vez que la región ventricular se ha colocado en posición caudal y la atrial es dorso-cefálica. Al mismo tiempo, las cavidades en desarrollo adquieren la simetría derecha-izquierda que les corresponde. Casi inmediatamente, aparece un tabique llamado *septum cardíaco primitivo* y constituido por tres elementos:

1. *Septum primum*, separa los atrios. (Figura 6)
2. Cojines ventral (superior) y dorsal (inferior) del canal atrioventricular y
3. Septum interventricular primitivo, divide la región trabeculada de los ventrículos.

También existen dos orificios, el foramen primum en la región atrial y el foramen interventricular en la región ventricular.

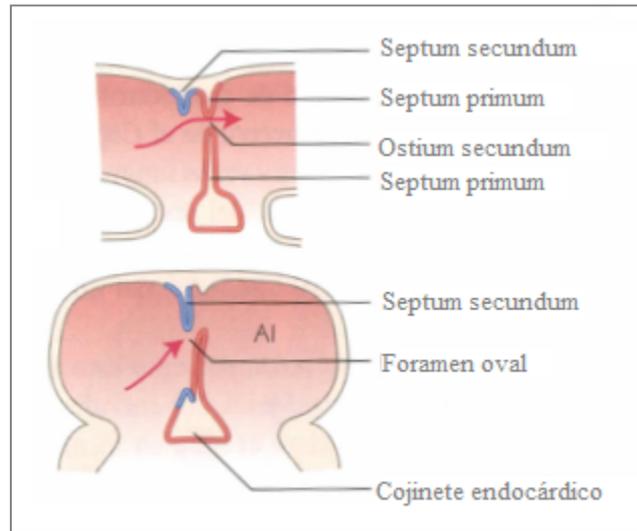


Figura 6: Ilustración representativa de la tabicación auricular a la quinta semana de edad gestacional. Imagen tomada y modificada de (Webster Samuel 2013)

En el caso del tracto de salida tanto el segmento proximal como el distal forman un conducto continuo que emerge exclusivamente del ventrículo derecho en desarrollo. No obstante, ya contienen en su interior crestas endocárdicas que comienzan a separarlo en dos conductos: anterolateral y posteromedial. El primero dará origen al infundíbulo del ventrículo derecho y el segundo se piensa que participa en el desarrollo del vestíbulo del ventrículo izquierdo. Por su parte, en el segmento distal las crestas se están transformando en las válvulas arteriales que todavía están poco desarrolladas. Respecto a la morfogénesis del segmento proximal de cada una de las grandes arterias (tronco de la arteria pulmonar y tronco de la aorta), se forma a partir del saco aórtico, que es un ensanchamiento que se produce en el sitio donde surgen los arcos aórticos y se proyecta a la cavidad pericárdica cuando el proceso de septación del corazón ha avanzado notablemente. Al inicio el saco aórtico es un conducto común, sin embargo una vez proyectado a la cavidad pericárdica, (aproximadamente el día 32), es dividido por el septum aórtico-pulmonar en dos conductos, pulmonar y aórtico (Figura 7).

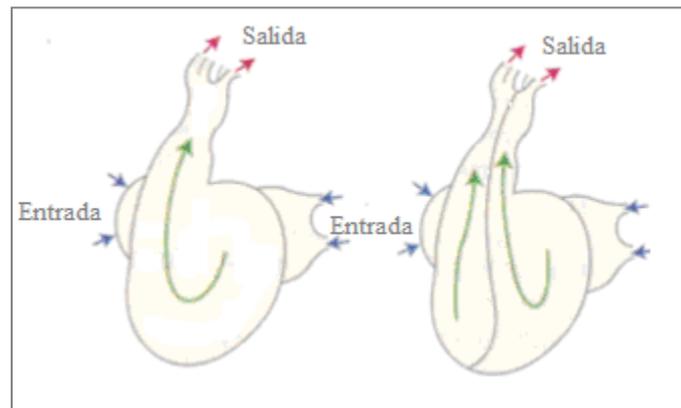


Figura 7: Representación esquemática de la formación del tabique conotroncal. El conducto de salida conotroncal desarrolla un par de crestas longitudinales en su superficie interna que crecen hacia el mismo punto hasta que se fusionan y forman el tabique conotroncal. Éste se continúa con el tabique interventricular para unir cada ventrículo con su arteria de salida. Imagen tomada de (Webster Samuel 2013)

Dicho septum está constituido por células de la cresta neural cardíaca, ubicadas entre el cuarto y sexto arcos branquiales. Este hecho explica la relación que existe entre las cardiopatías tronco-conales y las anomalías faciales típicas del síndrome cardiovelofacial y el síndrome de Di George. (Kirby and Waldo 1990)

EMBRIOLOGÍA DEL TEJIDO ESPECÍFICO DE CONDUCCIÓN

Al comienzo del desarrollo, tal y como acabamos de ver, el corazón es un tubo cardíaco compuesto por un manto miocárdico rodeado de endocardio. Cada uno de los miocitos que lo forman puede ser considerado como un marcapaso en potencia. El miocardio en esta etapa del desarrollo se denomina primario o primitivo. La principal característica es que estas células poseen una tasa de crecimiento lenta y se sitúa rodeando la entrada y salida de la cámara auricular y la salida ventricular, dando lugar a 4 constricciones o anillos (sinusal, AV, interventricular y ventrículoarterial). **El miocardio primario** situado en estos anillos presenta una serie de características electrofisiológicas y moleculares diferentes al miocardio de trabajo:

- conducción lenta.
- automaticidad alta
- uniones gap con la proteína conexina 45 (Cx 45) y canales iónicos HCN4 con corrientes de hiperpolarización que juegan un papel importante en la actividad marcapasos del sistema de conducción.

En el corazón adulto, el miocardio primario mantiene estas características solo en el nodo sinusal, nodo AV y haz de His. El resto del miocardio sufre cambios a lo largo del desarrollo pasando a ser lo que denominamos **miocardio secundario** que posee características diferentes del miocardio primario, como son:

- Se despolariza rápidamente.
- Automaticidad lenta y contractilidad alta,
- Uniones gap con Cx40 y Cx43,
- Sus miocitos expresan el péptido natriurético atrial (PNA).

Diversos estudios han sugerido que la expresión de los factores de transcripción Tbx2 y Tbx3 suprimen la transformación de miocardio primario en miocardio de trabajo en zonas específicas del corazón. (Habets, Moorman et al. 2002), (Hoogaars, Tessari et al. 2004).

MIOCARDIO EMBRIONARIO Y MIOCARDIO ADULTO

El miocardio embrionario es una red esponjosa de fibras musculares cardíacas que ligan la pared miocárdica con la cavidad ventricular. De forma progresiva esa malla esponjosa de fibras se irá compactando en la dirección del epicardio al endocardio y de la base al ápex cardíaco. (Han, Bloomekatz et al. 2016)

2.3 ANATOMÍA CARDIACA

Situación del corazón

El corazón humano es un órgano compuesto por cuatro cámaras, dos aurículas y dos ventrículos, de tamaño variable en función de la edad, el sexo y la superficie corporal de cada individuo. En el lactante, representa 1/130 del peso total del cuerpo mientras que en el adulto alcanza 1/300 aproximadamente, siendo

el peso promedio en mujeres de 250 a 300 gramos y de 300 a 350 gramos en los hombres. Está situado en el mediastino anterior entre las regiones pleuropulmonares derecha e izquierda, sobre la porción mediana del diafragma (Figura 8). La cara anterior del corazón está formada por la aurícula derecha y, sobre todo, por el ventrículo derecho y, a través del pericardio, está en contacto con la cara posterior del esternón y los cartílagos condrocostales tercero al quinto (Figura 9). La cara posterior del corazón la forman la aurícula izquierda y las venas pulmonares y se relaciona con la aorta descendente y el esófago. La cara inferior se halla apoyada sobre el músculo diafragmático. Por último la punta o vértice corresponde al segmento apical del ventrículo izquierdo y se sitúa a la altura del cuarto o quinto espacio intercostal en la línea medio-clavicular.

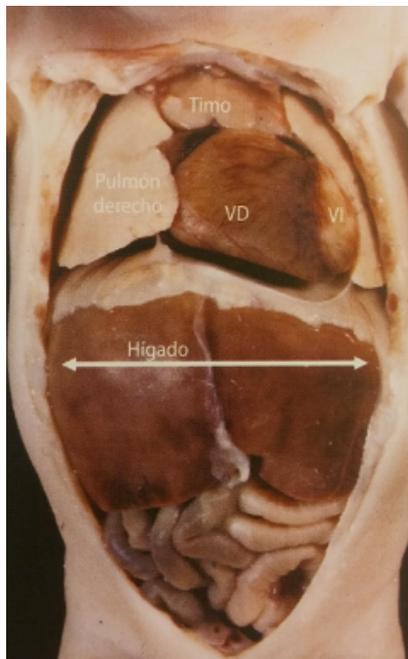


Figura 8: Imagen macroscópica que muestra la cara anterior de un feto tras eliminar las imágenes de la pared anterior del tórax y del abdomen. Se observa el corazón en la parte izquierda del tórax y su vértice hacia la izquierda. (Imagen tomada de Lindsey Allan 2010)

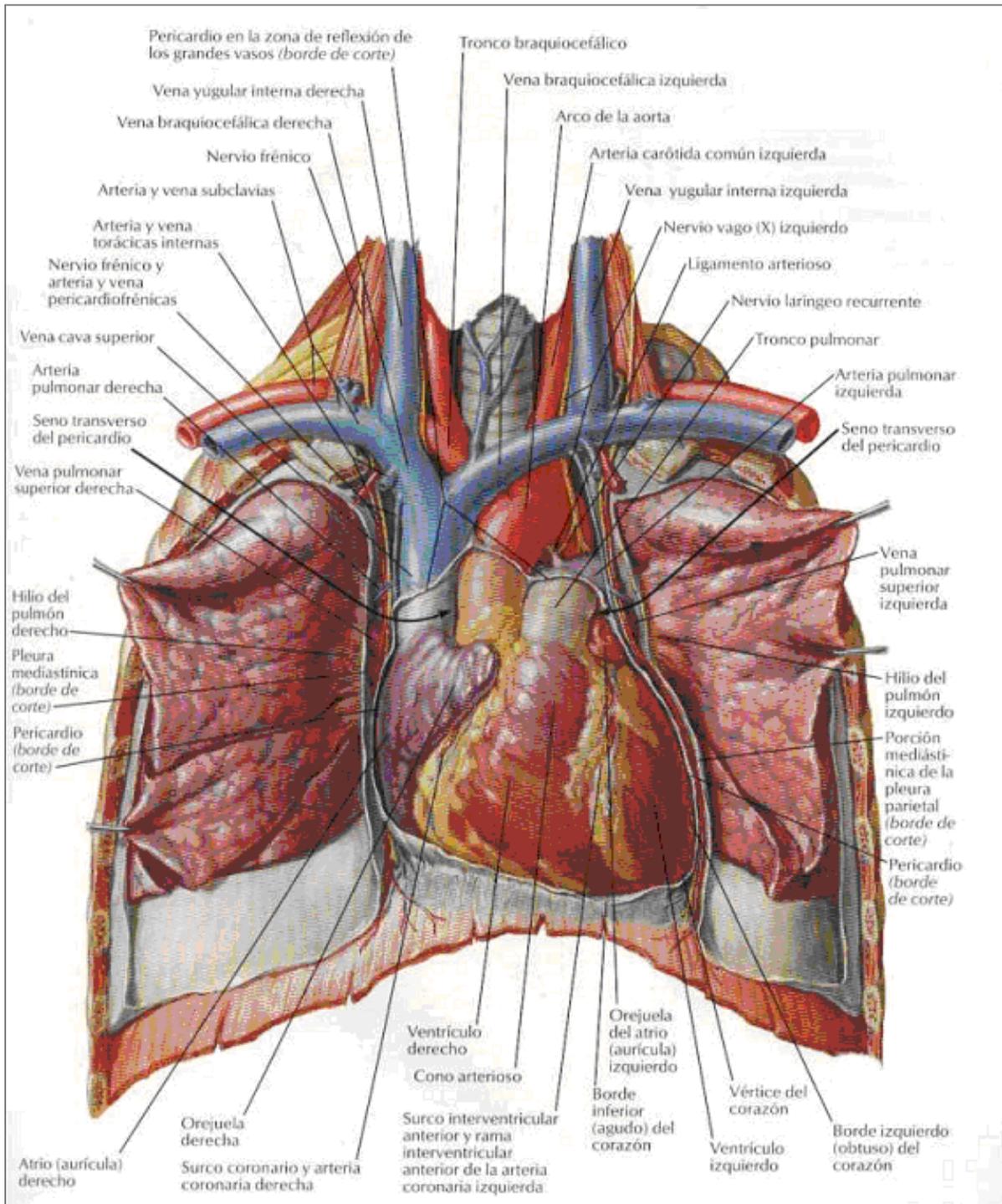


Figura 9. Ilustración de la cara anterior del corazón. (Imagen tomada de Netter 2011)

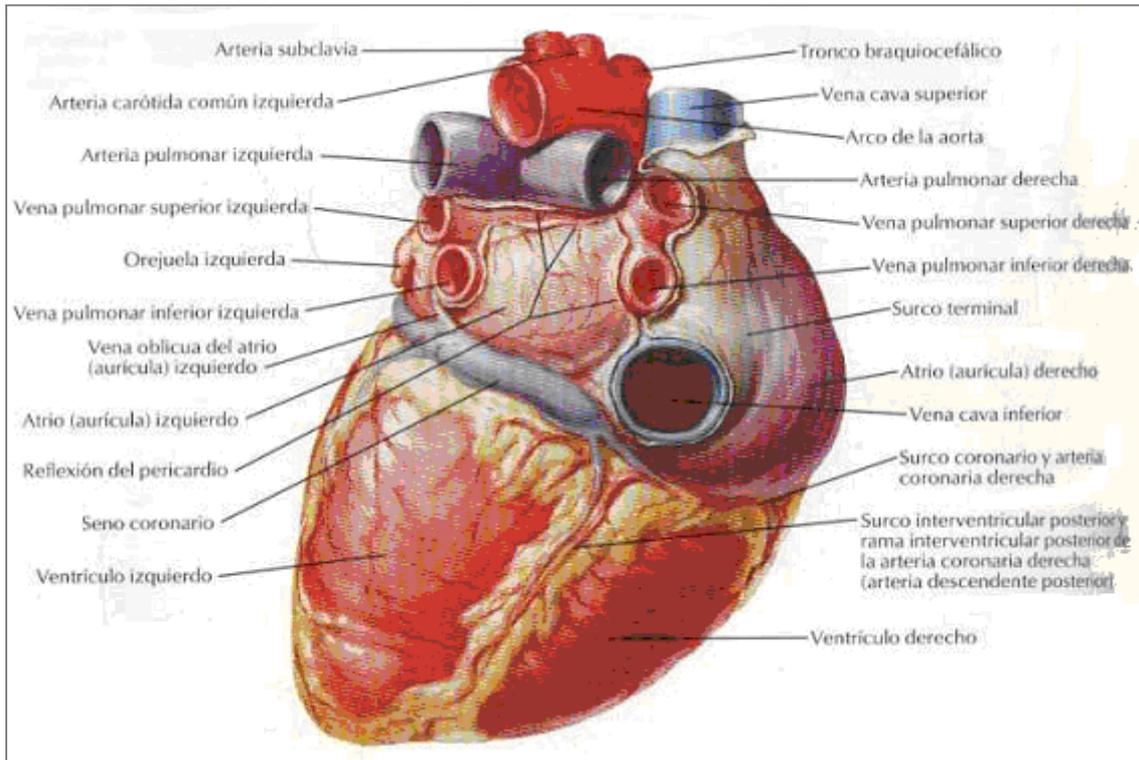


Figura 10. Ilustración de la cara basal y diafragmática del corazón. Visión posteroinferior. (Imagen tomada de Netter 2011)

Estructura del corazón

A. Pared cardiaca

- Epicardio
- Miocardio
 - Bases celulares de la contracción cardiaca
 - Diferencias miocardio auricular y ventricular
 - Miocardio embriológico
- Endocardio

B. Esqueleto fibroso

C. Cavidades cardiacas

D. Válvulas cardiacas

E. Sistema de conducción del corazón.

F. Grandes vasos

G. Irrigación del corazón: circulación coronaria.

H. Inervación del corazón

A. PARED CARDIACA

La organización estructural de la pared del corazón es continua en las aurículas y en los ventrículos y está compuesta por tres capas: el epicardio, el miocardio y el endocardio.

EPICARDIO

Membrana delgada de células mesoteliales planas y tejido conjuntivo subyacente, adherida a la superficie externa del corazón. Los vasos sanguíneos que irrigan el corazón –arterias y venas coronarias- y los nervios que lo inervan, discurren por el epicardio y están rodeadas por tejido adiposo que también se expande al epicardio. Esta capa corresponde y por eso también se denomina hoja visceral del pericardio seroso. El pericardio o saco pericárdico es una cubierta externa que rodea al corazón y que está dividida en dos partes: el *pericardio fibroso* o saco compacto que rodea al corazón. Y el *pericardio seroso*, constituido por dos hojas:

- Hoja parietal, que reviste interiormente el pericardio fibroso.
- Hoja visceral o epicardio, que se adhiere a la cara externa del corazón. Entre las hojas visceral y parietal existe un espacio que contiene una pequeña cantidad de líquido seroso, el líquido pericárdico, que lubrica ambas superficies y permite el movimiento de fricción del corazón dentro de la cavidad durante sus contracciones musculares.

Estructuralmente, el epicardio está cubierto en su superficie libre por una capa única de células mesoteliales. Por debajo del mesotelio hay una delgada capa de tejido conjuntivo con redes de fibras elásticas, vasos sanguíneos y células nerviosas. En el tejido conjuntivo laxo que rodea a los vasos coronarios hay abundante tejido adiposo.

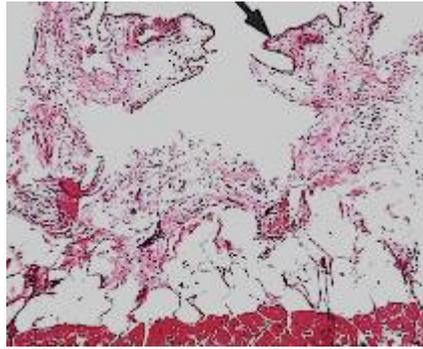


Figura 11. Epicardio. Microfotografía que muestra las células mesoteliales del epicardio (flecha), tejido adiposo y miocardio. Tinción con hematoxilina eosina. Imagen tomada de (Stacey E 2012)

MIOCARDIO

Es la capa muscular y constituye la mayor parte de la masa cardíaca. Está formado por células musculares estriadas, los miocitos cardíacos, de contracción involuntaria. A diferencia de las fibras musculares estriadas esqueléticas, el músculo cardíaco posee unas estructuras exclusivas: los **discos intercalares** (Figura 12).

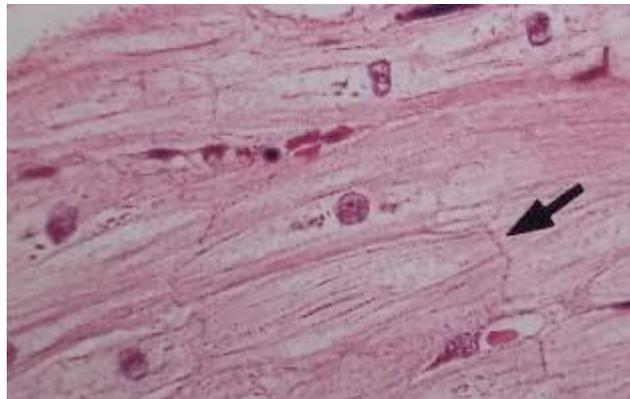


Figura 12: Sección de miocardio que muestra fibras musculares con sus discos intercalares (flecha). Tinción con hematoxilina eosina. Imagen tomada de Histology for Pathologist (Stacey E 2012)

Se trata de sistemas de adhesión especializados que actúan como nexo de unión entre células contiguas. Permiten un acoplamiento tanto mecánico como químico asegurando así una acción coordinada y una integración funcional de los miocitos. Los miocitos cardíacos se caracterizan por ser células mononucleares y poseer una menor longitud que las células del músculo esquelético. Tienen como componentes principales:

A) NUCLEO.

La ubicación central del núcleo de las células musculares cardíacas es una característica que ayuda a distinguirlas de las fibras musculares esqueléticas multinucleadas cuyos núcleos son subsarcoméricos.

En un corte transversal las **células musculares esqueléticas** presentan un perfil aproximadamente hexagonal (Figura 13-A). Cada célula posee varios núcleos que se localizan inmediatamente por debajo de la membrana celular y tienen una larga estructura cilíndrica con una longitud que puede llegar a alcanzar en el adulto hasta 10 cm dependiendo de su localización.

Las **células musculares cardíacas** por su parte, aparecen como lobuladas o elípticas en un corte transversal. El núcleo está localizado centralmente y presenta formas irregulares (figura 13-B). Entre las fibras discurren tabiques fibrocolagenosos que contienen pequeños vasos sanguíneos, pues entre las células cardíacas individuales hay un rico aporte sanguíneo capilar. En un corte longitudinal el músculo cardíaco aparece como una serie de cordones celulares en los que las fibras se unen a través de los discos intercalares.

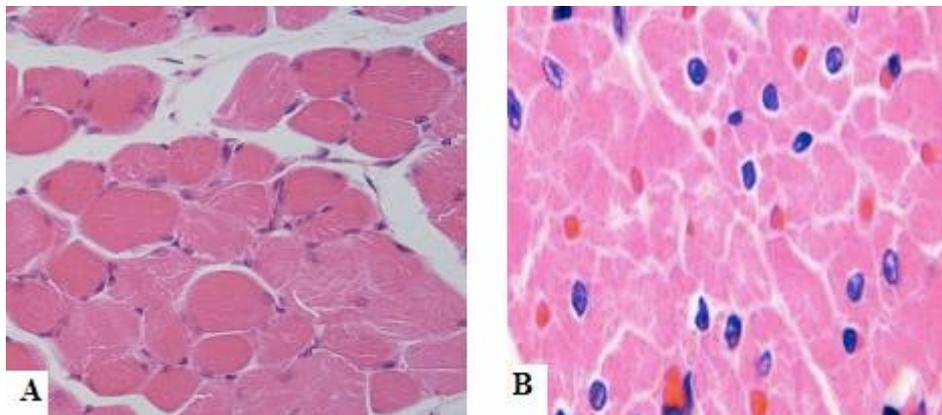


Figura 13. A) Corte transversal de músculo estriado esquelético. 400X. B) Corte transversal de músculo estriado cardíaco. Tinción con hematoxilina-eosina. Imagen tomada de Histology (Ross 2016)

B) CITOPLASMA O SARCOPLASMA que contiene:

Elementos contráctiles o miofibrillas

La unidad contráctil intracelular funcional del músculo cardíaco es el sarcómero, un conjunto ordenado de **filamentos gruesos** compuestos principalmente de miosina y de **filamentos finos** que contienen actina. Los

sarcómeros también contienen las proteínas reguladoras troponina y tropomiosina. La contracción del músculo cardiaco ocurre por el esfuerzo acumulativo de deslizamiento de los filamentos de actina entre los filamentos de miosina hacia el centro de cada sarcómero

Numerosas mitocondrias

Retículo sarcoplásmico, el cual está muy desarrollado pues se trata del reservorio de un reservorio de calcio necesario para la contracción.

C) MEMBRANA CELULAR O SARCOLEMA con sus invaginaciones hacia el interior del citoplasma que forman el sistema de túbulos transversos o túbulos T, para conducción de los impulsos.

La disposición de los haces musculares así como la cantidad y el diámetro de fibras musculares es diferente en las distintas cámaras del corazón. La pared de las aurículas es más delgada y está compuesta por fibras de pequeño diámetro. Sin embargo, el ventrículo izquierdo, que bombea la sangre al sistema arterial de gran presión, presenta una pared gruesa y sus fibras son las de mayor diámetro.

****BASES CELULARES DE LA CONTRACCIÓN CARDIACA**

El sarcómero es la unidad funcional contráctil del miocardio y tiene dos tipos de filamentos: gruesos y finos (Figura 14). Los filamentos finos están formados por una proteína contráctil en doble hélice, la actina y por unas proteínas reguladoras: troponina y tropomiosina. Los filamentos gruesos están formados principalmente por miosina, proteína de gran peso molecular constituida por una zona alargada y otra globular con actividad ATPasa, que interacciona con la actina. Por tanto, la actina participa en la contracción al estimular la actividad ATPásica de la miosina. La actividad de la actina está regulada por las proteínas reguladoras tropomiosina y troponina. Esta última a su vez tiene tres componentes, la troponina I que tiene una función inhibitoria interponiéndose entre las moléculas de actina y miosina; la troponina T, que une el complejo troponina a tropomiosina y la troponina C, que fija el calcio en tres lugares de su estructura (Figura 15).

Al microscopio se observa una alternancia de bandas oscuras o bandas A y bandas claras o bandas I. En las bandas A hay filamentos finos y filamentos gruesos. En las bandas I solo hay filamentos finos. En el centro de cada banda I existe una línea oscura denominada línea Z que corresponde al punto de unión entre los filamentos finos de una sarcómera con la sarcómera adyacente. Por su parte, en el centro de la banda A se haya una línea, línea M hacia donde se orientan las partes globulares de la miosina.

Durante la contracción, la longitud de los filamentos no varían sino que se producen interacciones entre los filamentos de miosina y los de actina, de tal forma que los de actina se deslizan hacia el centro de la banda A. Por lo tanto, durante la contracción, la banda A no varía de longitud, mientras que la banda I se acorta y las líneas Z se aproximan entre sí, acortándose por lo tanto las sarcómeras.

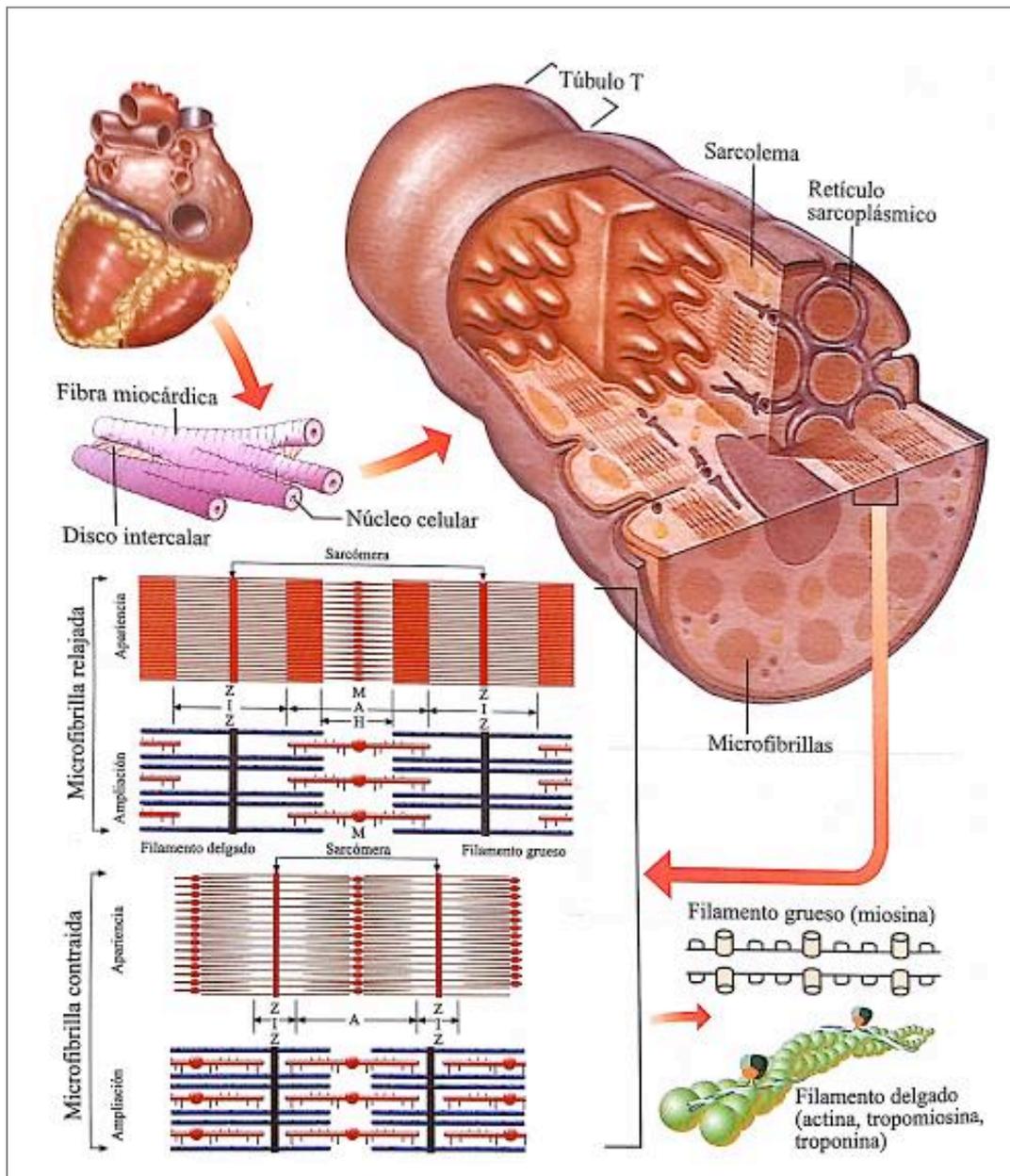


Figura 14: Estructura simplificada del sarcómero. Representación de los elementos estructurales y ultraestructurales del miocardio contráctil. Imagen tomada de Apuntes de cardiología (Guindo SOLdevilla 2004)

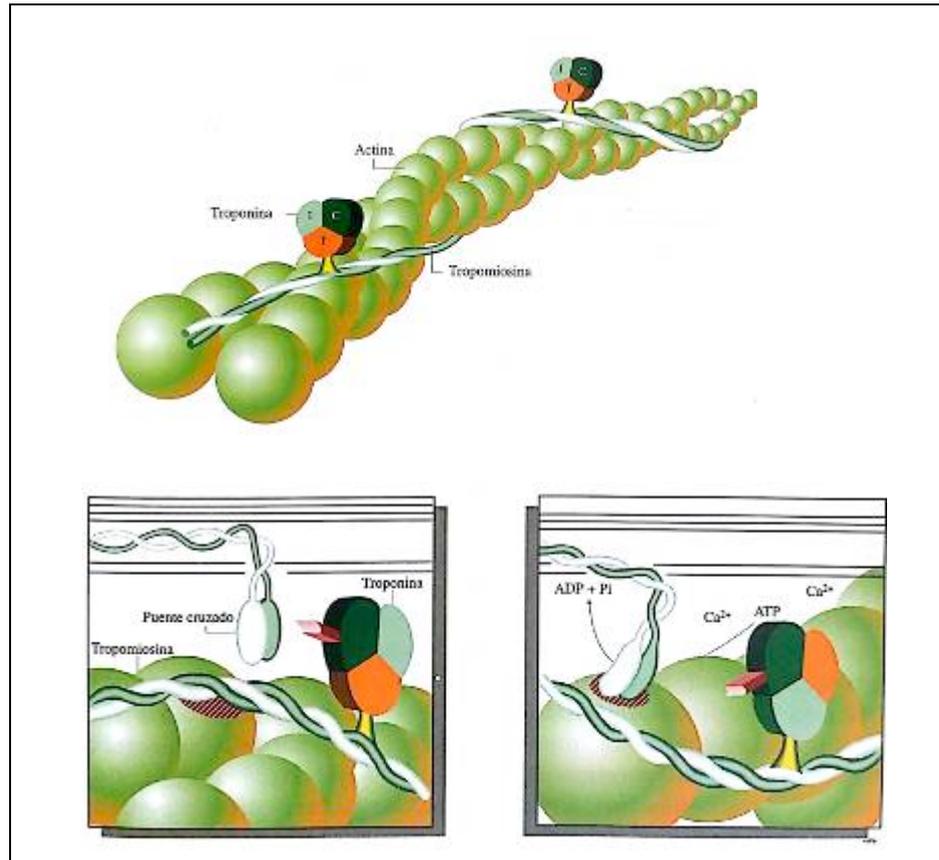


Figura 15: Esquema representativo del proceso de contracción muscular. Los puentes cruzados (cabezas de la miosina) se unen a los lugares específicos de combinación de la actina y la traccionan, después de que la tropomiosina haya sido desplazada lateralmente por la unión del calcio a la troponina C. Imagen tomada de Apuntes de Cardiología, (Guindo Soldevilla 2004)

**DIFERENCIAS CITOLÓGICAS ENTRE EL MÚSCULO CARDIACO AURICULAR Y VENTRICULAR

Las fibras del miocardio auricular son semejantes a las de los ventrículos pero tienen un diámetro promedio más pequeño (Figura 16). Otra diferencia es la presencia de gránulos auriculares específicos que se concentran en la porción central del sarcoplasma que se extiende a lo largo de los polos del núcleo, de ordinario cerca de un complejo de Golgi. Tienen apariencia de gránulos de secreción. Han sido identificadas en el músculo auricular dos hormonas polipeptídicas

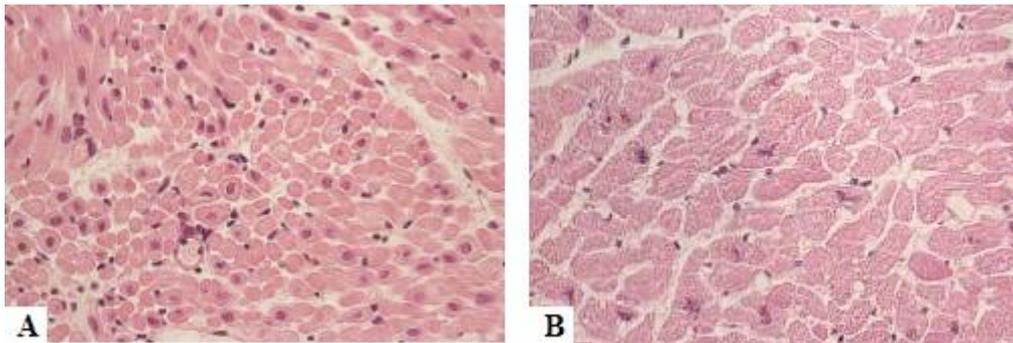


Figura 16: Sección transversal de miocitos auriculares (Fig A) y ventriculares (Fig B) fotografiados al mismo aumento. Hematoxilina- eosina. 400X. Imagen tomada de Histology (Ross 2016)

ENDOCARDIO

Membrana endotelial que reviste las cavidades cardíacas, los velos valvulares y las cuerdas tendinosas. Se puede dividir en tres capas. La **capa interna** la constituyen células endoteliales planas que se continúan con las células endoteliales que tapizan los vasos que llegan y salen del corazón. Inmediatamente por debajo del endotelio, hay una capa gruesa de tejido conjuntivo que constituye la **capa media**. Esta es la capa más gruesa y está constituida por fibras de colágeno organizadas regularmente que contienen un número variable de fibras elásticas estructuradas en paralelo y algunos miofibroblastos. Por último, la capa más externa, también llamada **capa subendocárdica** está en contacto directo con el miocardio y está compuesta por fibras de colágeno dispuestas irregularmente que se unen al colágeno que rodea las fibras musculares adyacentes. Contiene vasos sanguíneos, nervios y puede contener algunas fibras del sistema de conducción. Esta capa está ausente en los músculos papilares y en las cuerdas tendinosas.

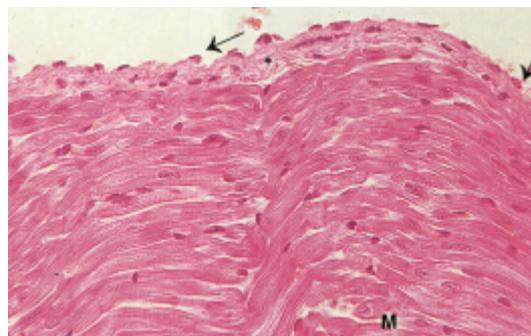


Figura 17. Endocardio (*) formado por tejido conjuntivo revestido por endotelio (flechas). Externamente se sitúan las fibras musculares del miocardio (M). Hematoxilina-eosina. 400X. Imagen tomada de (Ross and Pawlina 2016)

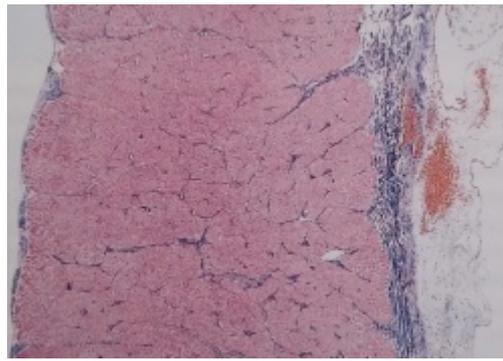


Figura 18: Microfotografía de la pared del ventrículo derecho que muestra la distribución de las fibras de colágeno desde el endocardio (izquierda) hasta el epicardio (derecha) en un corazón normal. Tinción tricómica de Masson. Imagen tomada de (Stacey E 2012)

B. ESQUELETO FIBROSO DEL CORAZÓN

Estructura central de soporte del corazón. Está formado por el conjunto de anillos fibrosos de las válvulas auriculoventriculares y sigmoides y la porción membranosa de los tabiques interauricular e interventricular.

Los cuatro anillos se sitúan aproximadamente en un plano que coincide con la base ventricular: el más anterior es el anillo de la sigmoide pulmonar. Inmediatamente detrás y la derecha se halla el anillo aórtico, y por último, los anillos auriculoventriculares. Por su parte, la porción membranosa del tabique interventricular está constituida por un denso tejido conjuntivo que contiene un segmento del Haz auriculoventricular no ramificado perteneciente al sistema de conducción cardiaco.

El esqueleto fibroso del corazón sirve como soporte semirrígido de las válvulas cardiacas así como de puntos de fijación del miocardio. Además actúa como un eficaz aislamiento electrofisiológico entre aurículas y ventrículos ejerciendo de barrera eléctrica entre ambos.

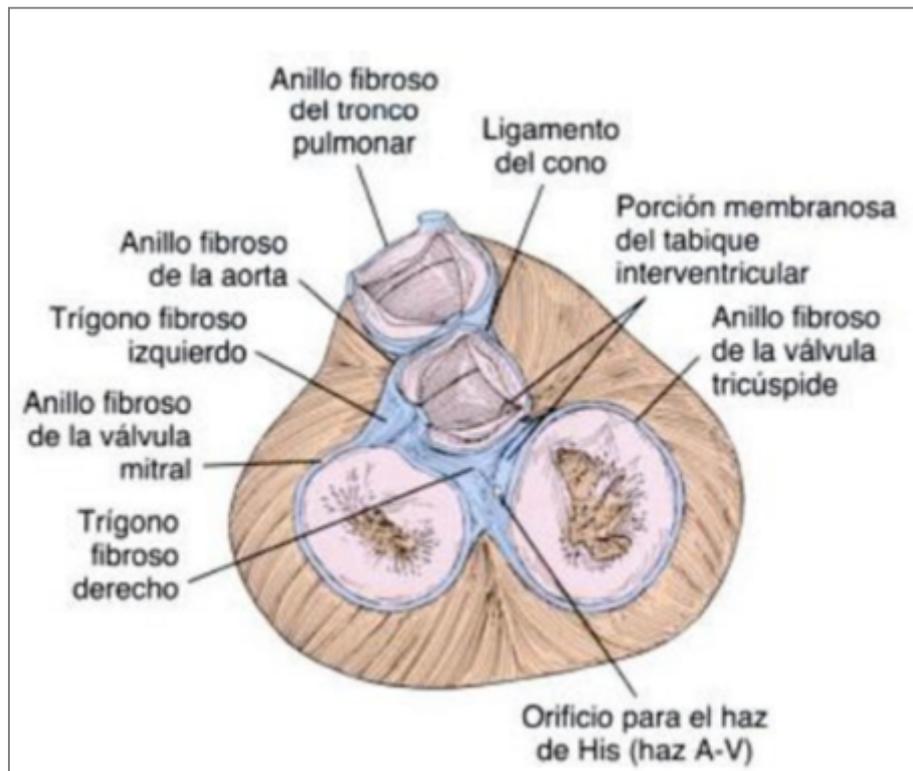


Figura 19. Esqueleto fibroso del corazón. Tomado de (Guindo Soldevilla 2004)

El esqueleto cardíaco está constituido por tejido conjuntivo denso. Los anillos fibrosos que rodean a los orificios auriculo-ventriculares contienen algo de grasa y fibras elásticas, pero fundamentalmente tejido conjuntivo denso. La estructura del septo membranoso tiene una orientación más regular de los haces de colágeno dispuestos en capas.

C. CAVIDADES CARDIACAS

El interior del corazón humano está dividido en cuatro cámaras o cavidades cardíacas.

AURÍCULAS

Las aurículas tienen una función de reservorio, acumulando sangre durante la sístole ventricular para verterla durante la diástole a los ventrículos, a través de las válvulas auriculoventriculares.

AURÍCULA DERECHA

La aurícula derecha ocupa una posición anterior, superior y derecha. Está constituida por dos partes: una posterior que deriva del seno venoso embriológico, de paredes lisas, que se conoce como cuerpo de la aurícula o seno venoso que está situado posteriormente entre la desembocadura de la vena cava superior, vena cava inferior y el plano auriculoventricular. La otra parte, que deriva de la aurícula derecha embriológica, se sitúa en posición anterolateral y presenta numerosas rugosidades musculares por la protusión de músculos pectíneos. Ambas regiones están separadas entre sí por una banda muscular denominada crista terminalis que se extiende a lo largo de la parte posterior de la aurícula derecha y marca la división embriológica de ambas partes.

Recibe la sangre venosa sistémica a través de las venas cava inferior y superior y la sangre procedente del miocardio a través del seno coronario, que llega a través del surco interventricular posterior. La sangre venosa de la mitad superior del cuerpo alcanza la aurícula derecha a través de la vena cava superior la cual, a su desembocadura no presenta ninguna estructura valvular. En la desembocadura de la vena cava inferior a la aurícula derecha existe una pequeña válvula: la **Válvula de Eustaquio**. Durante la vida embrionaria la valva de Eustaquio tiene un papel importante en dirigir la sangre hacia el foramen oval. Durante la vida adulta esta válvula no desempeña ninguna función y con frecuencia está perforada, es muy pequeña e incluso no existe. Cuando la válvula de Eustaquio puede persistir en la vida adulta constituyendo una estructura en "encaje" conocida como **red de Chiari**. El seno coronario drena la sangre venosa procedente de las venas cardíacas hacia la aurícula derecha a través de un orificio situado entre la desembocadura de la vena cava superior y la válvula auriculoventricular. El orificio de desembocadura del seno coronario tiene también una pequeña válvula, denominado **válvula del seno coronario o válvula de Tebesio**

En la pared lateral de la aurícula derecha se abre la orejuela derecha que es un fondo de saco de aspecto cuadrangular muy musculoso en su interior. La parte inferior está formada por el orificio auriculoventricular derecho, provisto de la válvula tricúspide, que conecta la aurícula con el ventrículo derecho. En la pared

anterolateral, junto a la entrada de la vena cava superior, se encuentra el nodo sinoauricular, primer elemento del sistema de conducción del corazón.

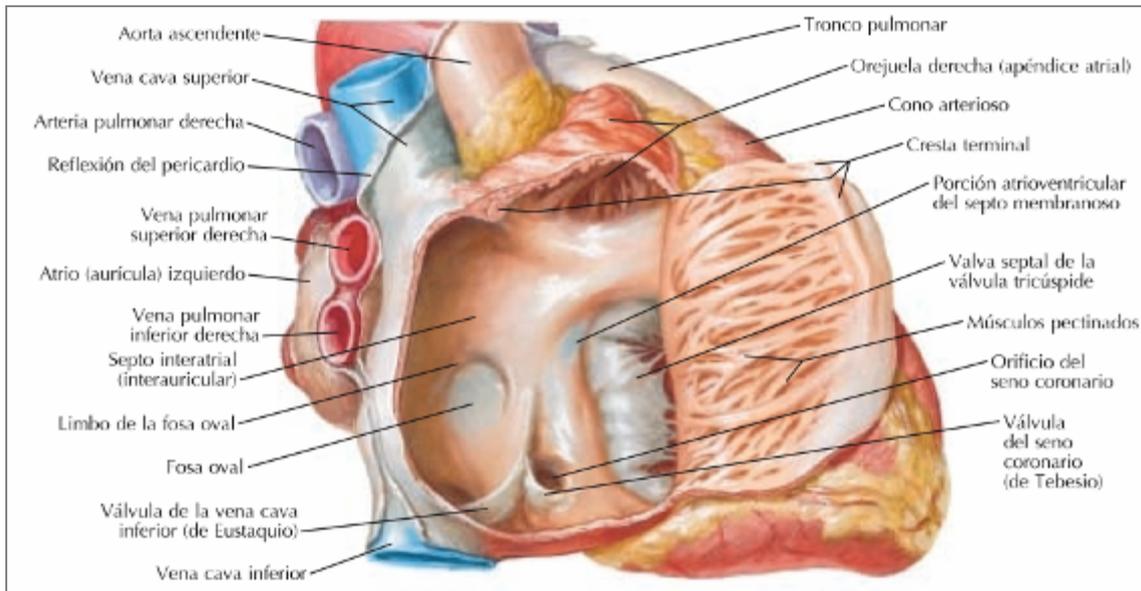


Figura 20: Ilustración que muestra el interior de la aurícula derecha desde su cara lateral derecha.

Imagen tomada de (Netter 2011)

TABIQUE INTERAURICULAR

El tabique interauricular es muscular, excepto su porción media, que es ovalada, fibrosa, con un repliegue en su borde anterior, **la fosa oval**, cubierta por una membrana desde el lado izquierdo del tabique. Se trata del remanente del foramen oval o agujero oval que conectaba durante la vida fetal, la aurícula derecha y la izquierda. El **tabique atrioventricular**, comprendido entre el tabique interauricular y el interventricular corresponde a la inserción de la valva septal de la tricúspide y la valva anterior de la válvula mitral. Así, la parte derecha de este tabique corresponde a la aurícula derecha, mientras que su cara izquierda corresponde al ventrículo izquierdo. Se trata de un punto de referencia anatómico importante porque contiene elementos del sistema de conducción del corazón.

AURÍCULA IZQUIERDA

La aurícula izquierda ocupa la posición más posterior del corazón. Recibe la sangre procedente de la circulación pulmonar a través de cuatro venas pulmonares. En su región superoanterior se encuentra la **orejuela izquierda**, alargada y triangular o

digitiforme, frecuentemente multilobada y curvada hacia la derecha de modo que rodea el tronco pulmonar. La pared interior de la aurícula izquierda es más lisa que la de la aurícula derecha excepto la de la orejuela izquierda donde existen numerosas protusiones musculares. La cara inferior está formada por el orificio auriculoventricular izquierdo, que conecta con el ventrículo izquierdo cerrado por la válvula mitral.

VENTRÍCULOS

Son cavidades irregulares que se comunican con las aurículas a través de los orificios auriculoventriculares. La sangre sale de cada ventrículo por dos gruesos troncos arteriales.

VENTRÍCULO DERECHO

El ventrículo derecho está localizado anterior e inferior a la aurícula derecha. Constituye la mayor parte de la superficie anterior del corazón. Se subdivide – morfológica y funcionalmente- en dos porciones: posteroinferior o cámara de entrada que se extiende desde el orificio de la válvula tricúspide hasta el ápex y anterosuperior, infundibular o tracto de salida que se dirige por la cara anterior desde la punta hasta la arteria pulmonar.

La **cámara de entrada** del ventrículo derecho está muy trabeculada y contiene los músculos papilares donde se insertan las cuerdas tendinosas de la válvula tricúspide. En la unión de la cara anterior de la cámara de entrada con el septum interventricular se encuentra una larga banda muscular que termina en el músculo papilar anterior, localizado casi en el ápex del ventrículo derecho, denominada banda moderadora.

Los músculos papilares son extensiones de forma cónica del músculo ventricular que se insertan en las cúspides de la válvula tricúspide, a través de unas cuerdas fibrosas denominadas cuerdas tendinosas. Se pueden agrupar en tres grupos: anteriores, posteriores y septales pudiendo existir uno o varios músculos papilares en cada grupo además de pequeñas cuerdas tendinosas que se anclan directamente en las paredes ventriculares.

El músculo papilar anterior tiene su origen en la banda moderadora y se conecta a través de las cuerdas tendinosas, con las cúspides anterior y septal de la válvula tricúspide. Los músculos papilares septales se localizan en el septum interventricular y envían cuerdas a la valva septal y posterior. Existe un pequeño músculo único casi en contacto con el tracto de salida llamado **músculo papilar del infundíbulo, conal o de Lushka** que envía cuerdas a la valva septal. Los músculos papilares posteriores se encuentran en la cara diafragmática y envían cuerdas a las valvas posterior y anterior.

El infundíbulo o tracto de salida del ventrículo derecho se extiende desde el ápex hasta la válvula pulmonar. Puede dividirse a su vez en una parte proximal constituida por numerosas trabéculas musculares prominentes y una distal muscular de aspecto endocárdico liso que termina en la válvula pulmonar. La banda septal o trabeculación septomarginalis es un músculo en forma de Y griega que en la parte superior presenta dos brazos: el anterosuperior y el posteroinferior los cuales abrazan el septum conal. La parte inferior de la banda septal está relacionada con la banda moderadora y el músculo papilar anterior. El septum conal o cresta supraventricular es una estructura septal situada entre las dos ramas de la banda septal. Las dos válvulas semilunares y tractos de salida derecho e izquierdo se sitúan a cada lado del septo conal. Por último, la banda parietal es la porción del infundíbulo situada en la pared libre del ventrículo derecho.

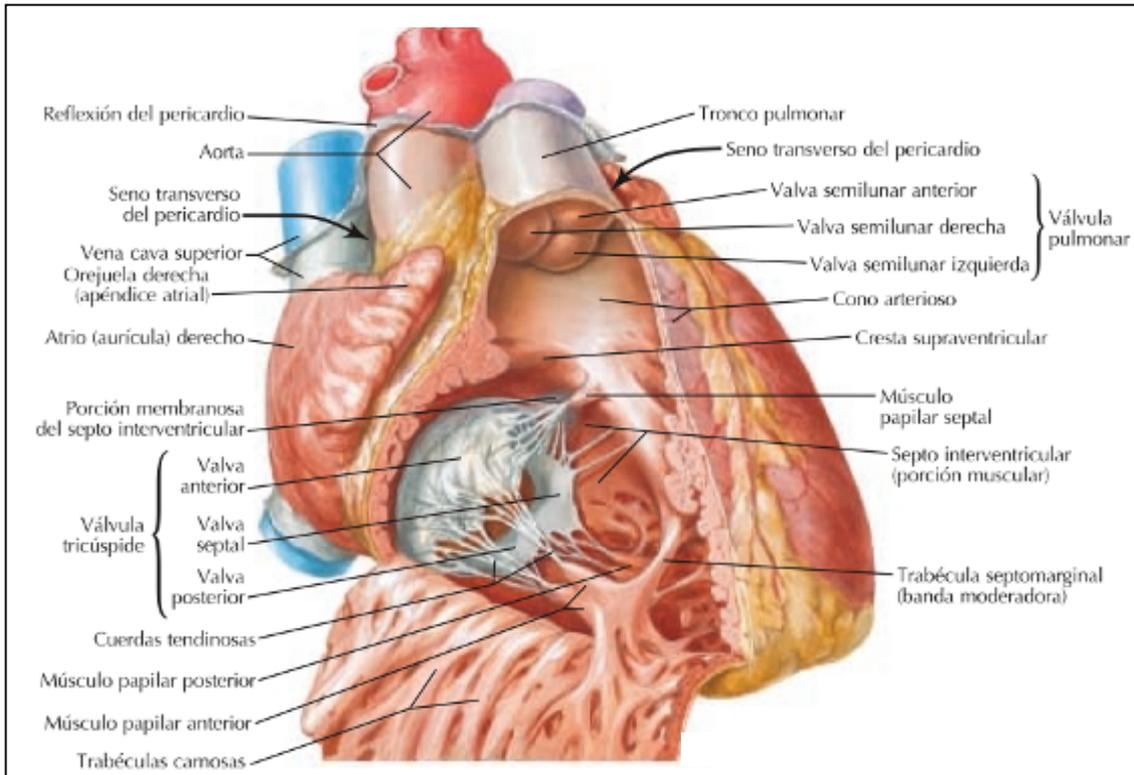


Figura 21: Ilustración que muestra el interior del ventrículo derecho desde una visión anterior.

Imagen tomada de (Netter 2011)

VENTRÍCULO IZQUIERDO

El ventrículo izquierdo está situado anterior e inferior a la aurícula izquierda. Es muy distinto morfológicamente del ventrículo derecho pues no posee trabéculas musculares que subdividan la cavidad. Al igual que el VD, posee un **tracto de entrada y un tracto de salida**. Pero a diferencia de éste la división es más funcional que anatómica ya que, los tractos de entrada y de salida se encuentran paralelos, debido a la alineación de los anillos mitral y aórtico, unidos por el trígono izquierdo del esqueleto fibroso. La valva anterior de la mitral se continúa con la valva no coronariana de la aórtica. El interior de la cavidad es liso y contiene dos músculos papilares, anterior y posterior. Éstos reciben las cuerdas tendinosas de las dos hojas de la válvula mitral: la cúspide anterior de mayor tamaño y la cúspide menor situada posteriormente. Las paredes del ventrículo izquierdo son más hipertróficas con un grosor máximo a nivel de la base y mínimo en la punta

D. ESTRUCTURAS VALVULARES

Las cuatro válvulas cardíacas, compuestas por repliegues del endocardio y una placa central de tejido conectivo están ancladas a los anillos que forman parte del esqueleto fibroso del corazón. Cada válvula auriculoventricular está dividida en un número determinado de valvas que se unen entre sí en las comisuras. Del lado ventricular, cada válvula está unida a las paredes musculares por cuerdas tendinosas que se insertan sobre las paredes del ventrículo y sobre todo, en los músculos papilares del corazón. Éstos, pertenecen también al aparato valvular y son prominencias musculares cónicas. Las válvulas sigmoideas están constituidas por tres valvas, de forma semilunar, que se fijan a un engrosamiento fibroso de la pared arterial.

Estructuralmente, las valvas son pliegues endocárdicos que envuelven un tejido fibroso rico en colágeno. Cada **válvula auriculoventricular** está formada por una lámina flexible de tejido conjuntivo, cubierta en su cara auricular y ventricular por una capa de endocardio. La placa fundamental de tejido conjuntivo está formada en su mayor parte por tejido parecido al cartílago, el tejido condroide denso que contiene células pequeñas fusiformes o redondeadas y sustancia intersticial basófila (capa fibrosa). La capa endocárdica es más gruesa en la cara auricular. Aquí el estrato subendotelial tiene una pequeña cantidad de tejido condroide y se apoya sobre una capa de tejido conjuntivo, que contiene muchas redes de fibras elásticas y algunas fibras musculares lisas (capa esponjosa). En torno al anillo fibroso, la capa subendocárdica es muy laxa y la musculatura de la aurícula penetra profundamente en ella. En la cara ventricular, el estrato endocárdico tiene una estructura semejante pero es mucho más delgado. El tejido en esta capa ventricular está formado por tejido conjuntivo denso con estratos de fibras colágenas y elásticas. Las válvulas sigmoideas tienen la misma estructura general que las válvulas aurículo-ventriculares. En medio del borde libre forman un engrosamiento llamado el nódulo de Arancio.

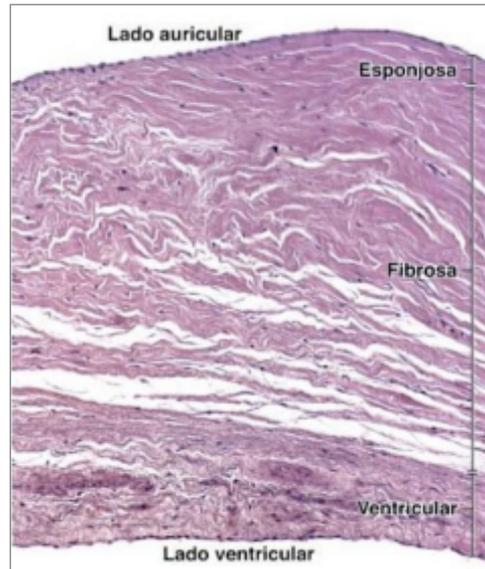


Figura 22: Corte a través de una valva de la válvula mitral cerca de su inserción en el anillo fibroso. Ambas superficies están revestidas de endotelio. Imagen tomada de (Geneser 1985)

TRICÚSPIDE

La anatomía del complejo valvular está compuesta por el anillo, las valvas, las cuerdas tendinosas y los músculos papilares. El anillo tiene una forma circular flexible, que se amolda con cada contracción ventricular. La válvula tricúspide se considera como un velo único fibro-esponjoso con tres hendiduras, que limitan tres valvas. Vistas desde la aurícula derecha se reconocen una **valva septal** (interna), **una valva anterior** (la más grande) y **una posterior** (que presenta tres festones). La cara auricular es lisa y la cara ventricular es rugosa. De forma aproximadamente triangular, cada valva posee una base que se implanta en el anillo y un borde libre que sirve de zona de coaptación con las otras dos durante el cierre valvular en sístole. El punto donde se unen la base y los bordes libres de las dos valvas adyacentes se denomina **comisura**. La base de la valva septal se relaciona con el área del nódulo aurículo-ventricular del sistema de conducción. La cara ventricular de la tricúspide posee tres regiones: una zona rugosa, en relación con el borde libre, una zona lisa que corresponde al cuerpo de la valva y una zona basal que se corresponde con la parte homónima. A cada una de estas zonas van a insertarse **cuerdas tendinosas**, las cuales reciben el nombre de la

región en la que terminen (cuerdas de la zona rugosa, de la zona lisa, de la zona basal y cuerdas comisurales). Son estructuras de fibro-colágeno de color blanco que poseen una inserción proximal en las valvas y una distal en los **músculos papilares** o directamente en la pared ventricular. Las cuerdas y los músculos forman el **aparato subvalvular**.

MITRAL

El **anillo mitral** es una formación fibrosa cuya región anterior y medial comparte fibras con el anillo aórtico. La **válvula mitral** es bivalva. Vista desde la aurícula izquierda, una hendidura central limita dos valvas: una anteroseptal y una postero basal. La **valva anterior** es la valva de mayor tamaño, tiene una forma triangular y su borde libre no posee festones. Su base se continúa con la fibrosa mitroaórtica y con la comisura que une la valva coronariana izquierda con la no coronariana de la válvula aórtica. La **valva posterior**, de menor tamaño, posee **tres festones**: uno central que es el más grande, uno medial que es el más pequeño y uno lateral. La cara auricular es lisa, la cara ventricular, al igual que la tricúspide posee tres zonas: una rugosa en el borde libre, una lisa en el cuerpo de la valva y una zona basal. Con el desarrollo de la cirugía valvular a cada valva se la divide en tres zonas denominadas con una letra, A o P se trate de la valva anterior o posterior y un número del 1 al 3 según se trate del tercio medial, medio o lateral. A cada una de estas zonas y también a las comisuras llegan **cuerdas tendinosas** que conforman una imagen de embudo con el conjunto de valvas.

AORTA

La válvula sigmoidea aórtica posee tres valvas semilunares que se insertan en la pared de la arteria aorta. La pequeña dilatación, en forma de nido, entre la pared de la arteria aorta y las valvas semilunares se denominan **senos aórticos de Valsalva**, senos de Morgagni, o de Otto. Hay tres senos de Valsalva: izquierdo, derecho y posterior. El seno aórtico izquierdo da origen a la arteria coronaria izquierda; el seno aórtico derecho da origen a la arteria coronaria derecha; por lo general no hay vasos sanguíneos que se originen del seno aórtico de Valsalva

posterior, es por ello que se lo conoce como el seno aórtico no-coronario. Cada valva semilunar posee un engrosamiento fibroso en el centro de su borde libre, el **nódulo aórtico** (de Morgagni), que dejan a cada lado de sí una superficie fibrosa más delgada llamada **lúnula valvar**. Desde su cara superior y desde un punto de vista cínico las valvas se pueden clasificar en: **Valva coronariana derecha**: es la mas anterior de las tres y contiene al ostium de la coronaria derecha. Se relaciona con la orejuela de la aurícula derecha por adelante; **Valva coronariana izquierda**: Tiene a la orejuela de la aurícula izquierda por delante y su seno contiene al ostium del tronco de la coronaria izquierda; **Valva no coronariana**: posterior y hacia la derecha, su principal relación es compartir su anillo y continuarse con la valva anterior de la mitral.

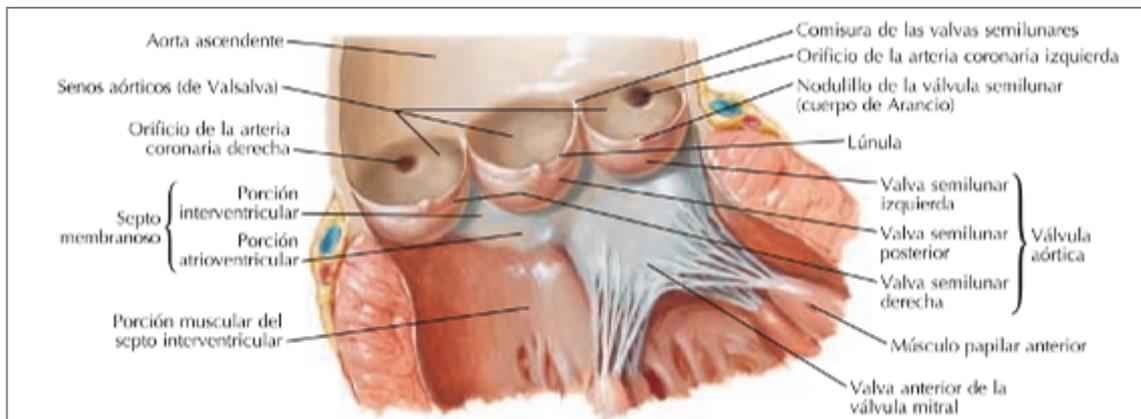


Figura 23: Ilustración de la válvula aórtica. Imagen tomada de (Netter 2011)

PULMONAR

Situada en un plano anterior respecto a la válvula aortica y orientada hacia la izquierda, la válvula pulmonar está constituida por una valva anterior y dos posteriores, izquierda y derecha. En el centro de cada valva el borde de cierre se une al borde libre y forma un pequeño relieve fibroso, el nodo de Arancio. A cada lado del nodo, las denominadas lúnulas representan las superficies de aposición de las valvas contiguas durante el cierre valvular.

E. SISTEMA DE CONDUCCIÓN CARDIACO

El sistema de conducción está compuesto por miocitos especializados en la génesis y conducción del impulso eléctrico cardiaco. La característica fundamental de estas células es precisamente el automatismo que es la capacidad de generar estímulos gracias a despolarizaciones espontáneas. Los componentes del tejido especializado de conducción cardiaca son:

El nodo sinoauricular

Está situado en el surco terminal en la zona de unión de la vena cava superior con la aurícula derecha en posición subepicárdica. La función intrínseca del nodo sinoauricular (NSA) consiste en ser la fuente de donde emana el ritmo cardiaco, siendo responsable de la onda P del electrocardiograma que representa la actividad auricular. La frecuencia de despolarización del NSA es de 60-100 por minuto en reposo. El resto de componentes del sistema de conducción tienen una frecuencia de despolarización menor, por eso en condiciones normales el marcapasos del corazón es el nodo sinoauricular.

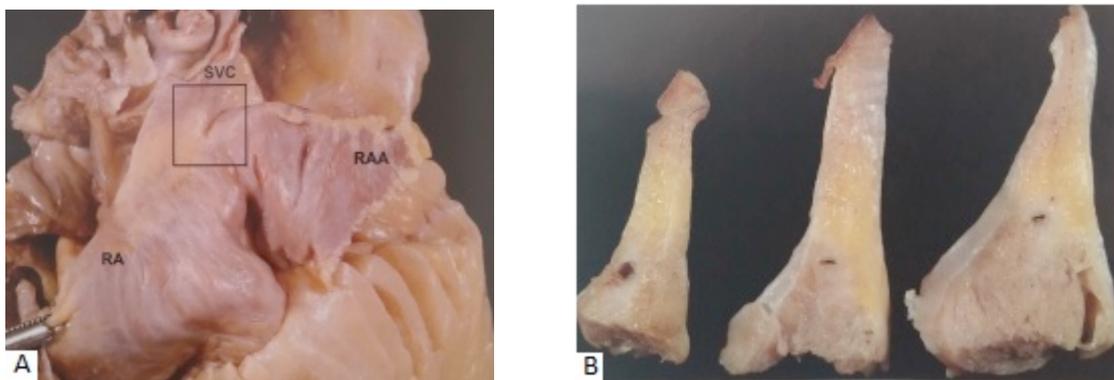


Figura 24. Nodo sinoauricular (NSA). A) Localización macroscópica. B) Cortes seriados del NSA (SVC: Vena cava superior. RAA: Apéndice auricular derecho. RA: Aurícula derecha. Imagen tomada de (Stacey E 2012)

Estructuralmente está constituido por células musculares modificadas que se caracterizan por ser marcadamente más pequeñas que las células musculares cardiacas ordinarias y están dispuestas en una red incluida en un tejido conjuntivo

abundante y más bien denso. En los cortes histológicos, las delgadas células nodales son fusiformes y cursan en diferentes direcciones entre los haces de colágeno, hasta el punto de que pueden ser difíciles de distinguir de los fibroblastos vecinos. El nodo sinoauricular está abundantemente innervado.

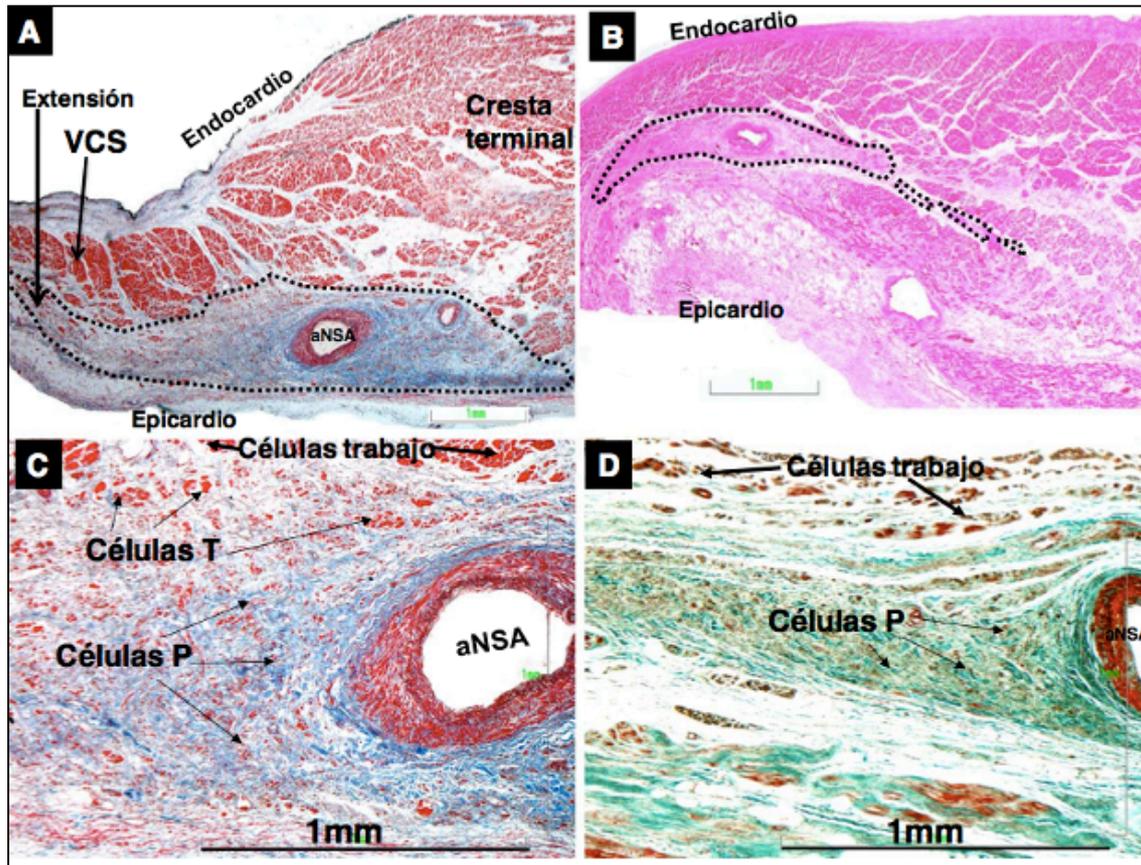


Figura 25: Secciones histológicas sagitales del NSA teñidas con tricrómico de Masson (A, C y D) y con hematoxilina-eosina (B).

A. Sección histológica a nivel del cuerpo del NSA (área punteada) en la que se observa su característica forma de arco, localizado subepicárdicamente en la zona de unión de la VCS con la cresta terminal. Nótese la extensión del nodo hacia la VCS. B. Sección histológica del NSA a nivel de su cola (zona punteada) en la que se puede observar su localización endocárdica y cómo el nodo se disgrega en grupos de miocitos entremezclados con los miocitos de trabajo.

C. Ampliación de la Fig. 25A, en la que se observa las células nodales principales (P) inmersas en una matriz de tejido conectivo dispuestas de manera aleatoria alrededor de la arteria del nodo sinusal, y las células transicionales (T), con características intermedias entre las células de trabajo y las células P. D. Sección histológica del NSA de un espécimen de 75 años de edad con cardiopatía isquémica estructural. Nótese el mayor acúmulo de tejido conectivo entre las células nodales P. NSA: nodo sinoauricular; aNSA: arteria del nodo sinoauricular; VCS: vena cava superior; AD: aurícula derecha. Imagen tomada de (Murillo, Cabrera et al. 2011)

El nodo aurículoventricular

Se sitúa en la porción inferior del surco interauricular próximo al septo membranoso interventricular, en el vértice superior del triángulo de Koch. Este triángulo se sitúa sobre la superficie endocárdica de la aurícula derecha y se encuentra delimitado anteriormente por la inserción del velo septal de la válvula tricúspide y posteriormente por un tendón fibroso llamado tendón de Todaro que es la continuación fibrosa subendocárdica de la válvula de Eustaquio. El ápex del triángulo corresponde con el septum membranoso interventricular y la base la forma el orificio del seno coronario.

Estructuralmente, las fibras del nódulo aurículo-ventricular son pequeñas como las del nodo seno-auricular.

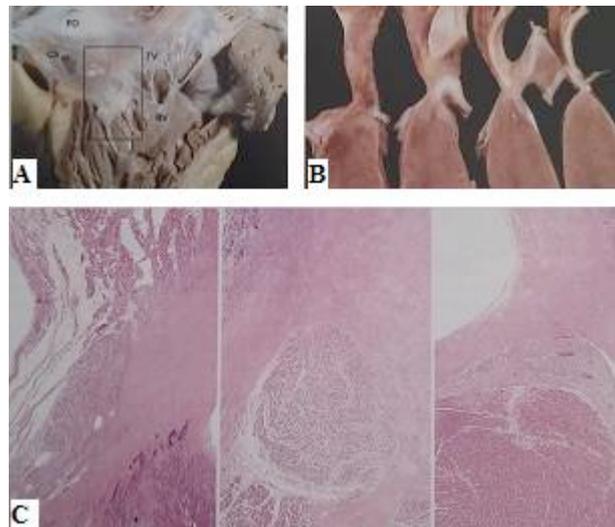


Figura 26. Nodo aurículoventricular. A) Localización macroscópica vista desde el ventrículo derecho. B) Cortes seriados del NAV que muestran la relación del tejido nodal con la válvula tricúspide, mitral, atrioventricular y esqueleto fibroso del corazón. C) Nodo AV (C1) sdfaasas. Imagen tomada de (Stacey E 2012)

Haz de His

El nodo aurículoventricular, en la parte cefálica del triángulo de Koch, se introduce en el cuerpo fibroso central y en ese punto es cuando pasa a denominarse haz penetrante de His, justo cuando se encuentra completamente rodeado de tejido conectivo que lo aísla por completo del miocardio de trabajo. El haz de His posee un trayecto de una longitud variable antes de continuarse sobre el septum muscular interventricular con las ramas derecha e izquierda.

Ramas del Haz de His

La rama de recha discurre por el interior del lado derecho del tabique interventricular hasta llegar a la base del músculo papilar septal del ventrículo derecho. Posteriormente penetra en el espesor de la trabécula septomarginal y de ese modo se extiende desde la pared septal a la pared anterior del ventrículo derecho a través de la banda moderadora dividiéndose finalmente en la red subendocárdica de Purkinje.

La rama izquierda es irregular en su espesor. Su origen se encuentra bajo la comisura situada entre los velos derecho y no coronárico de la válvula aórtica, después desciende subendocardicamente por el septum interventricular y termina ramificándose y extendiéndose hacia los músculos papilares del ventrículo izquierdo y dando lugar, finalmente a la red subendocárdica de Purkinje.

La red ventricular de Purkinje

Red ventricular que en el humano se localiza a nivel subendocárdico.

Estructuralmente tienen uno o dos núcleos situados en la masa central del sarcoplasma, el cual es abundante en mitocondrias y glucógeno. Las miofibrillas, relativamente escasas, están desplazadas a la periferia y son menos constantes en su orientación que las de las fibras musculares cardíacas ordinarias.

F. GRANDES VASOS

Los grandes vasos que comunican el corazón con el resto del cuerpo son:

- La vena cava superior
- La vena cava inferior
- Las cuatro venas pulmonares
- La arteria pulmonar
- La arteria aorta.

Describiremos a continuación las características estructurales de los grandes vasos centrándonos en las características histológicas de las arterias por ser objeto de nuestro estudio. Las paredes de todos los vasos están compuestas por tres capas o tunicas, que desde la luz hacia la parte externa se denominan:

- **Túnica íntima.**

Es la capa más interna compuesta por el **endotelio** que es un epitelio plano simple, la **membrana basal** y la capa subendotelial de tejido conectivo laxo. Las células endoteliales están fuertemente unidas entre sí por uniones ocluyentes y denexo. En la **capa subendotelial** de arterias y arteriolas se puede encontrar láminas de material elástico fenestrado que conforman la **membrana elástica interna**. Las fenestraciones permiten que las sustancias difundan con facilidad a través de esta lámina y alcancen las células más profundas de la pared del vaso.

- **Túnica media**

Formada por estratos circunferenciales de fibras musculares lisas, entre las cuales se hallan fibras elásticas y colágenas. En las arterias, esta capa es más gruesa y está limitada por una **membrana elástica externa** formada también por láminas elásticas. Las fibras elásticas y las láminas elásticas son sintetizadas por las células musculares lisas. La contracción regulada del músculo liso de esta túnica media reduce la luz de arterias y arteriolas lo cual lleva a un aumento de la tensión arterial y de la resistencia vascular. Por el contrario, la relajación de este músculo, induce a una vasodilatación produciendo los efectos opuestos.

- **Túnica adventicia**

Compuesta por tejido conectivo denso, el cual se entremezcla con el tejido conectivo laxo (fundamentalmente tejido colágeno de disposición longitudinal y unas pocas fibras elásticas) que rodea a los vasos. En esta túnica, se encuentran vasos más pequeños, que nutren al propio propio vaso **-vasa vasorum-** y nervios **-nervi vascularis-** que controlan la contracción del músculo liso de la túnica media. En las venas, la túnica adventicia es más gruesa.

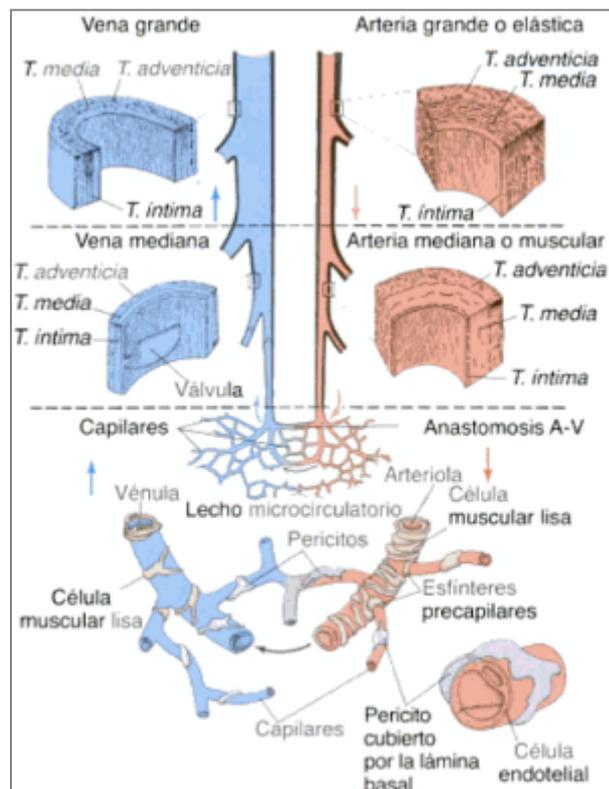


Figura 27: Diagrama esquemático de las características morfológicas de los vasos sanguíneos. Imagen tomada de (Stacey E 2012)

Las arterias se clasifican en tres tipos según su tamaño y según las características de la túnica media:

- Arterias grandes o elásticas
- Arterias medianas musculares
- Arterias pequeñas o arteriolas.

ARTERIAS ELÁSTICAS

Las arterias aorta y pulmonar son arterias elásticas. Con respecto a las características histológicas, en este tipo de arterias, abundan las láminas elásticas en la capa media, por lo que suele verse una serie de bandas onduladas acidófilas interpuestas entre los haces de fibras musculares lisas que se disponen concéntricamente, desde la membrana elástica interna hasta la membrana elástica externa. Entre las láminas elásticas se encuentran varias fenestraciones, las cuales facilitan la difusión de sustancias dentro de la pared arterial. Por su parte, las

fibras musculares lisas de la capa media sintetizan el colágeno, la elastina y las demás moléculas de la matriz extracelular. La túnica adventicia de este tipo de arterias es delgada, con presencia de fibras colágenas y elásticas no formando láminas sino como una red fibrilar laxa. Esta capa evita la distensión excesiva de las arterias durante la sístole. Además, los pequeños vasos sanguíneos presentes en la adventicia penetran parcialmente la túnica media aportando nutrición a la porción externa de la pared vascular, mientras que la porción interna se nutre desde la luz del vaso.



Figura 28: Corte transversal de una arteria elástica. A) Capa íntima (I) y parte de la media. La íntima es muy delgada, formada por una fina capa de tejido conjuntivo avascular y revestida por células endoteliales cuyos núcleos sobresalen en la luz del vaso. Hematoxilina-eosina. 400X B) Capa media: superposición de láminas elásticas fenestradas, teñidas de rosa por la eosina. Entre ellas se sitúa el componente celular formado principalmente por fibras musculares lisas y fibroblastos. Hematoxilina-eosina. 400X. C) La capa adventicia (A) está constituida por tejido conjuntivo pobre en fibras elásticas. En la parte más externa presenta ovulillos adiposos. Hematoxilina-eosina. 400X. Imagen modificada de (Ross and Pawlina 2016)

ARTERIAS MUSCULARES

Respecto a las arterias musculares es interesante destacar que no existe un punto de diferenciación exacto entre este tipo de arterias y las elásticas, sino que se produce un cambio gradual desde éstas hacia las arterias musculares y muchas veces hay vasos intermedios entre ambas. La principal diferencia entre estos dos tipos de vasos es que en la capa media de las arterias musculares, desaparecen las láminas elásticas para dejar paso a una predominancia casi absoluta de fibras musculares lisas. Por esta misma razón, al faltar las láminas elásticas de la capa media, en este tipo de arterias se hace bien evidente la presencia de las membranas elásticas interna y externa. Otras particularidades de estas arterias, se refieren a la capa íntima, la cual no posee prácticamente tejido conectivo

subendotelial y a la adventicia, cuyo espesor es aproximadamente similar al de la capa media.

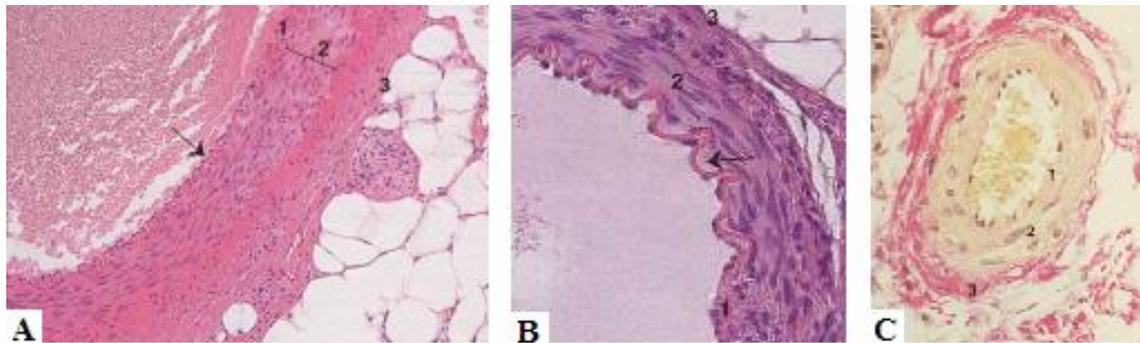


Figura 29. Cortes transversales de arterias musculares de distinto calibre. Se aprecia la capa íntima (1), media (2) muscular, cuyo espesor disminuye progresivamente desde la arteria de gran calibre (Fig 29-A) a la más pequeña (Fig 29- C), formada solamente por 2 o 3 capas de miocitos lisos. Más externamente se aprecia la capa adventicia (3). El límite entre la capa íntima y media aparece bien marcado en las dos areria musculares mayores por la lámina elástica interna (flecha). Hematosilina-eosina. Van Geisson. 200X, 400X, 400X. Imagen modificada de (Ross and Pawlina 2016)

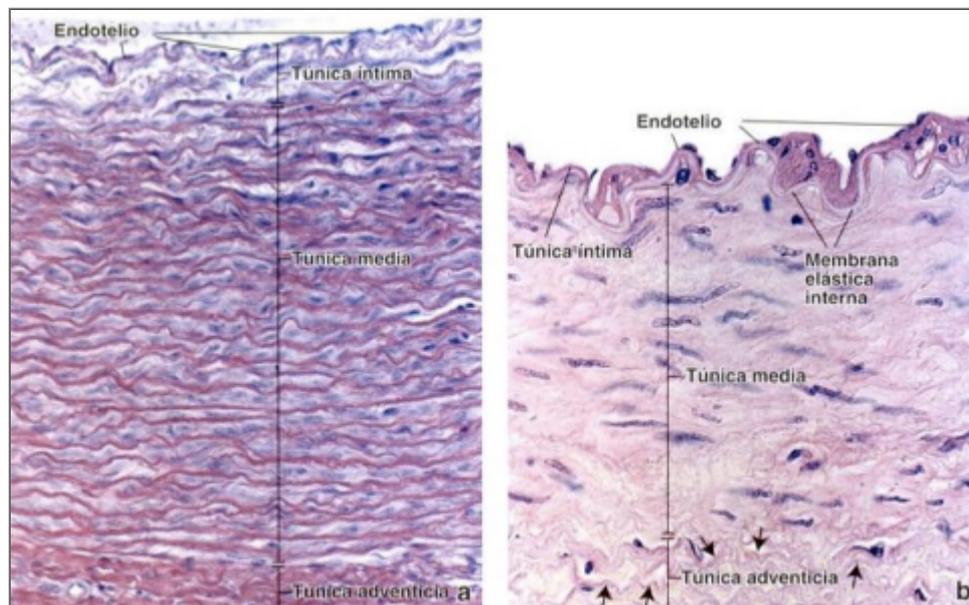


Figura 30: Microfotografía de la pared de una arteria elástica y una arteria muscular. Imagen modificada de (Geneser 1985)

A) Corte transversal de aorta humana. Se identifican la túnica íntima con un revestimiento de células endoteliales que se apoya sobre una fina capa de tejido conjuntivo con células musculares lisas, macrófagos y fibras colágenas y elásticas. El límite con la túnica media no es nítido. La túnica media contiene abundantes células musculares lisas y membranas elásticas fenestradas (laminas onduladas rojas). La adventicia carece de membrana elástica y está compuesta en su mayor parte por tejido conjuntivo. Contienen los vasos sanguíneos y los nervios que irrigan e inervan la pared de la aorta. 300X, tinción con resorcina-fucsina.

B) Corte transversal de la pared de una arteria muscular. La túnica interna consiste en un revestimiento endotelial, una pequeña cantidad de tejido conjuntivo y la membrana elástica interna. Esta estructura tiene un aspecto ondulado si el vaso está contraído. La túnica media la componen fundamentalmente células musculares lisas de disposición circular y fibras colágenas y elásticas. La túnica adventicia consiste sobre todo en tejido conjuntivo. Aunque la membrana elástica externa suele ser evidente en este corte no es evidente aunque si son obvias varias siluetas de material elástico (flechas). 360X, tinción con hematoxilina eosina.

G. VASCULARIZACIÓN CARDIACA

Dada la constante actividad contráctil del corazón, éste presenta unas demandas de energía muy grandes y por tanto requiere una importante irrigación arterial.

ARTERIAS CORONARIAS

Se encargan de la irrigación del miocardio. Son dos, izquierda y derecha, ambas originadas en los senos aórticos de Valsalva. Desde su origen se dirigen hacia la parte anterior del surco auriculoventricular discurriendo inicialmente por la superficie del epicardio hasta hacerse finalmente intramiocárdicas con una amplia variabilidad en la distribución de las ramas principales. En las arterias coronarias del corazón humano, la túnica media -limitada como de ordinario en ambas caras por las membranas elásticas interna y externa- aparece dividida por una gruesa membrana fenestrada en dos porciones, una interna y otra externa. Esta capa

íntima de las arterias coronarias, difiere del resto de las arterias musculares. Ello se debe a que en el recién nacido, en los sitios de ramificación de las arterias coronarias, emigren a la túnica íntima células musculares lisas indiferenciadas de la túnica media, pasando por las fenestraciones de la lámina elástica interna. Estas células indiferenciadas secretan elastina y pueden formar unas "almohadillas" músculo elásticas.

Arteria coronaria derecha.

Se origina en el seno de Valsalva derecho casi perpendicularmente a la aorta y se dirige hacia la derecha por detrás de la arteria pulmonar y por debajo de la orejuela derecha, discurriendo por el surco auriculoventricular hasta llegar al borde derecho del corazón, donde se hace posterior. Continúa por el surco auriculoventricular y se bifurca en la **arteria coronaria descendente posterior** – que se dirige a la punta cardiaca e irriga la cara inferior del ventrículo izquierdo y proporciona numerosas ramas septales- y el **tronco de las arterias posterolaterales**. En su trayecto, la arteria coronaria derecha emite ramas auriculares importantes -la arteria del nódulo sinusal, el nodo auriculoventricular- y ramas ventriculares.

Arteria coronaria izquierda.

Se origina en el seno de Valsalva izquierdo describiendo un ángulo agudo y discurre inicialmente en un trayecto mucho más corto que la coronaria derecha denominado tronco común. Después se bifurca en dos ramas:

La **arteria descendente o interventricular anterior**: Da ramas septales anteriores y ventriculares izquierdas y derechas, a medida que desciende hacia el ápex. Una colateral más amplia es la arteria diagonal izquierda destinada que discurre por la pared libre anterior del ventrículo izquierdo.

Arteria circunfleja: Nace del tronco común y discurre por el surco auriculoventricular izquierdo dando ramas auriculares y ventriculares. Destaca la arteria marginal izquierda que, a su vez, emite también ramas ventriculares. Existen anastomosis entre las dos grandes arterias coronarias, pero quizá demasiado distales para que el déficit de una sea suplido por la otra.

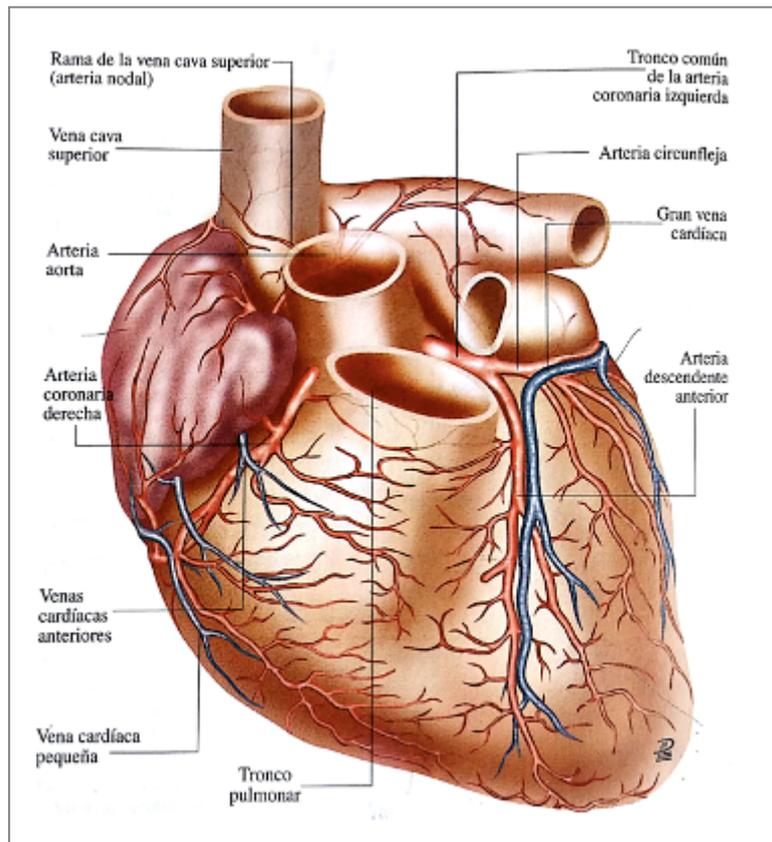


Figura 31: Ilustración de la vascularización del corazón, desde una vista anterior. Imagen tomada de (Guindo SOLdevilla 2004)

Drenaje venoso

La circulación venosa coronaria consta de tres sistemas: las venas mínimas de Tebesio, las venas anteriores del ventrículo derecho y las venas tributarias del seno coronario. Las venas de Tebesio y las venas anteriores desembocan directamente en las cavidades cardíacas del lado derecho y las venas del seno coronario constituyen el colector venoso principal.

El seno coronario es una estructura venosa situada en la región posterior del surco auriculoventricular izquierdo que drena en la aurícula derecha, por encima de la válvula tricúspide. Recoge la sangre venosa de gran parte del corazón y en él desembocan:

- La vena coronaria mayor.

La sangre venosa de la aurícula y ventrículo izquierdo convergen en la vena interventricular anterior de forma paralela a la arteria coronaria descendente

anterior para convertirse a nivel del surco auriculoventricular en una gran vena cardíaca que desemboca en el seno coronario. Antes de conformar el origen del seno coronario, recibe la vena marginal izquierda.

- Vena coronaria menor.

Procede del ventrículo derecho (vena marginal derecha) y sigue el surco atrioventricular hasta el seno coronario.

- Vena interventricular posterior.
- Vena posterior del ventrículo izquierdo.

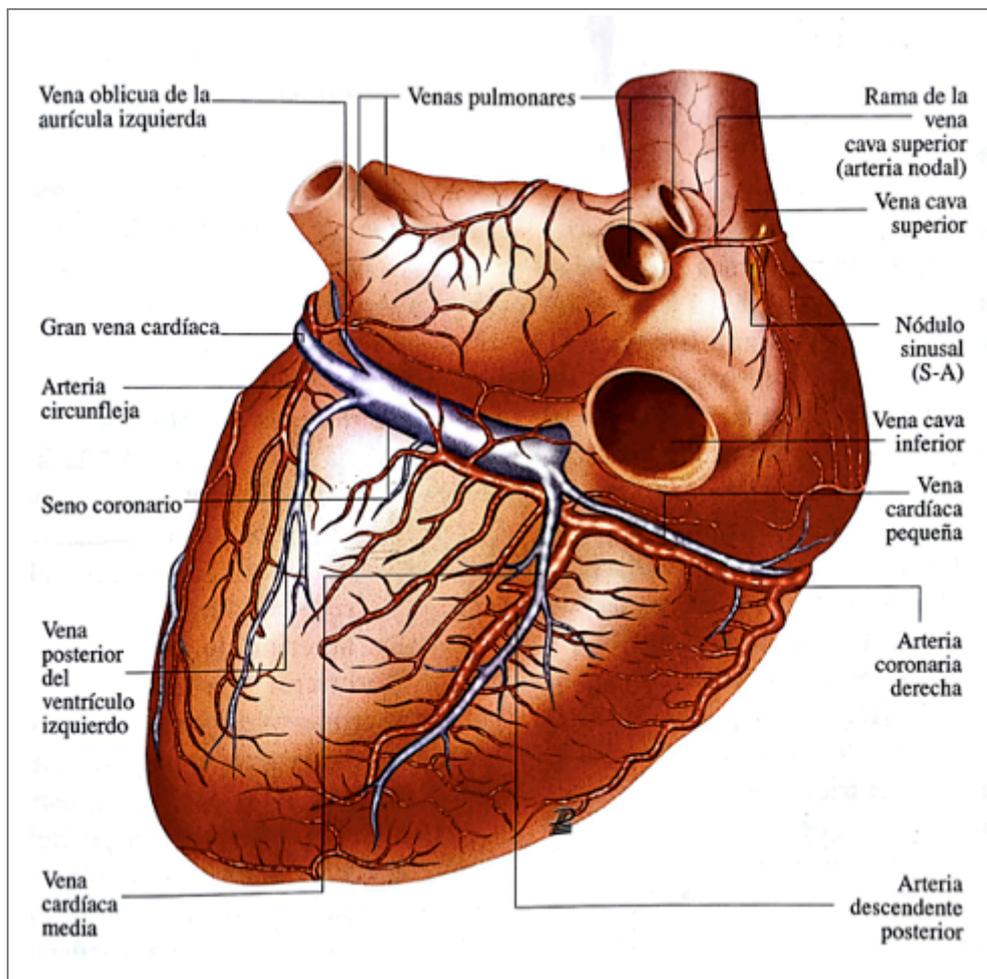


Figura 32: Drenaje venoso cardíaco. Imagen tomada de (Guindo Soldevilla 2004)

Drenaje linfático

Los linfáticos del corazón drenan en los conductos linfáticos derecho e izquierdo que fluyen en sentido inverso a las arterias coronarias respectivas y, paralelos a la aorta ascendente confluyen antes de drenar en un ganglio linfático pretraqueal

situado por debajo del cayado aórtico, que se vacía finalmente en el conducto linfático derecho.

H. INERVACIÓN DEL CORAZÓN

La actividad cardiaca está regulada por diversos factores, entre los cuales, el sistema nervioso autónomo ha sido considerado clásicamente el factor más importante. Así la actuación de la inervación simpática y parasimpática en el tejido cardiaco sería la principal responsable del control de cuatro variables cardiovasculares básicas: la frecuencia cardiaca, la presión sanguínea, el volumen sistólico y la resistencia vascular periférica (Loewi 1921, Levy, Pappano et al. 2007),

A) INERVACIÓN PARASIMPÁTICA CARDIACA.

Origen central

La inervación cardiaca parasimpática proviene del nervio vago y contiene tanto fibras aferentes como eferentes.

Fibras nerviosas eferentes

El sistema nervioso parasimpático (SNPs) eferente está compuesto por dos grupos neuronales: el primero llamado preganglionar y el segundo llamado postganglionar. Las neuronas preganglionares se originan en el núcleo ambiguo (NA) y el núcleo dorsal del vago (NDV) situados en el tronco cerebral. Las neuronas postganglionares nacen en los ganglios intracardiacos.

El nervio vago nace a nivel del surco lateral posterior del bulbo y abandona el cráneo junto con los pares craneales IX y XI por el agujero rasgado posterior. A este nivel el nervio se engruesa para formar el ganglio yugular o superior. Junto a la base del cráneo presenta un segundo engrosamiento que es el ganglio inferior o plexiforme. Ambos ganglios, yugular y plexiforme, son también sensitivos y contienen las fibras sensitivas aferentes del vago. El nervio continúa descendiendo por el paquete vasculo nervioso del cuello. En el lado derecho, cuando penetra en el tórax forma el plexo esofágico donde se une con el nervio del lado izquierdo para formar los troncos vagales anterior y posterior. Los diversos nervios procedentes del vago, después de llegar al plexo cardiaco inervarán las distintas estructuras

cardiacas, fundamentalmente la zona auricular y nodo sinoauricular. (Ardell and Randall 1986), (Kawashima 2005).

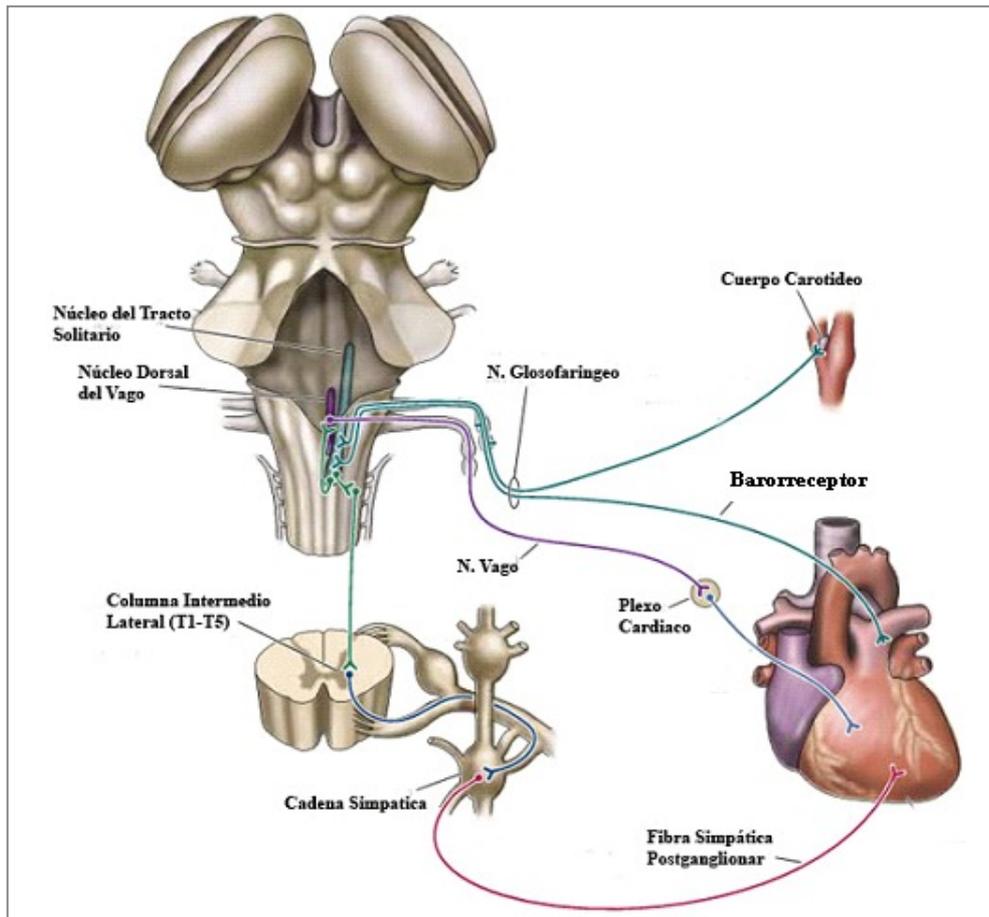


Figura 33: Ilustración de la regulación autonómica cardiovascular. Incluye el corazón con el sistema nervioso intrínseco, sistema intratorácico con agrupaciones ganglionares, células preganglionares espinales y el tallo cerebral. Imagen tomada de (Iversen 2001)

Fibras nerviosas aferentes

Las fibras aferentes se proyectan desde el corazón al núcleo del tracto solitario (NTS) localizado en la porción superior del bulbo raquídeo, el cual recibe información no sólo del sistema cardiovascular sino también de otras estructuras de la cabeza, cuello y distintos órganos. Además está regulado por una enorme cantidad de neurotransmisores y neuromoduladores. Desde el NTS las células enviarán sus proyecciones al NA y NDV, permitiendo así el control de muchas funciones. Un ejemplo de esto sería el llamado reflejo barorreceptor que controla la presión arterial. Las fibras aferentes del NTS que reciben información desde los

barorreceptores, estimulan al núcleo ambiguo, origen de la inervación parasimpática cardiaca. Así, un aumento de TA produce un aumento del tono parasimpático y una disminución refleja de la resistencia vascular, debido a una disminución del tono simpático vascular y por tanto una disminución de la tensión arterial y bradicardia refleja. (Ohta and Talman 1994), (Tsuboi, Furukawa et al. 2000). El principal neurotransmisor en el NTS es el L- Glutamato (Talman, Perrone et al. 1980), (Baptista, Zheng et al. 2005).

B) INERVACIÓN SIMPÁTICA CARDIACA

Origen central y fibras nerviosas eferentes

Las neuronas preganglionares simpáticas cardiacas se encuentran en el núcleo intermedio lateral del asta lateral de la médula espinal, a nivel de los cinco primeros segmentos torácicos. Sus axones salen de la médula espinal por las raíces anteriores de sus respectivos nervios hasta llegar a la cadena de ganglios simpáticos paravertebrales desde donde se dirigen a los ganglios cervicales superior, medio e inferior. Desde aquí se originan las fibras postganglionares que se dirigen al corazón.

Fibras nerviosas aferentes

Las vías aferentes simpáticas son las responsables de conducir los estímulos dolorosos. Ascenden hasta los ganglios simpáticos cervicales y torácicos penetrando en la médula por sus raíces dorsales. Posteriormente hacen sinapsis en el asa dorsal de los primeros segmentos torácicos y ascienden hasta el NTS, tálamo y corteza cerebral (Bengel 2011).

C) PLEXO CARDIACO

Anatómicamente, se han descrito dos plexos cardiacos fundamentales, el ventral o superficial y el dorsal o profundo. Estos plexos están formados por fibras del sistema autónomo simpático y parasimpático (Williams and Gray 1989).

Plexo cardiaco superficial o ventral: Constituido por el nervio cardiaco superior del simpático cervical izquierdo y por el nervio cardiaco superior parasimpático.

Situado por debajo del arco aórtico y ventral a la arteria pulmonar derecha, presenta más densidad de fibras simpáticas (Kawano, Okada et al. 2003).

Plexo cardiaco profundo o dorsal: Formado por las fibras cardiacas del simpático cervical y superior torácico y por las fibras cardiacas media e inferior del vago. Es más extenso que el superficial y se localiza por encima de la bifurcación pulmonar y posterior al arco aórtico. Presenta mayor densidad de fibras parasimpáticas.

Además de estos dos grandes plexos se describen los plexos coronarios que acompañan a la arteria coronaria derecha e izquierda y los plexos auriculares que se consideran prolongaciones de los plexos principales.

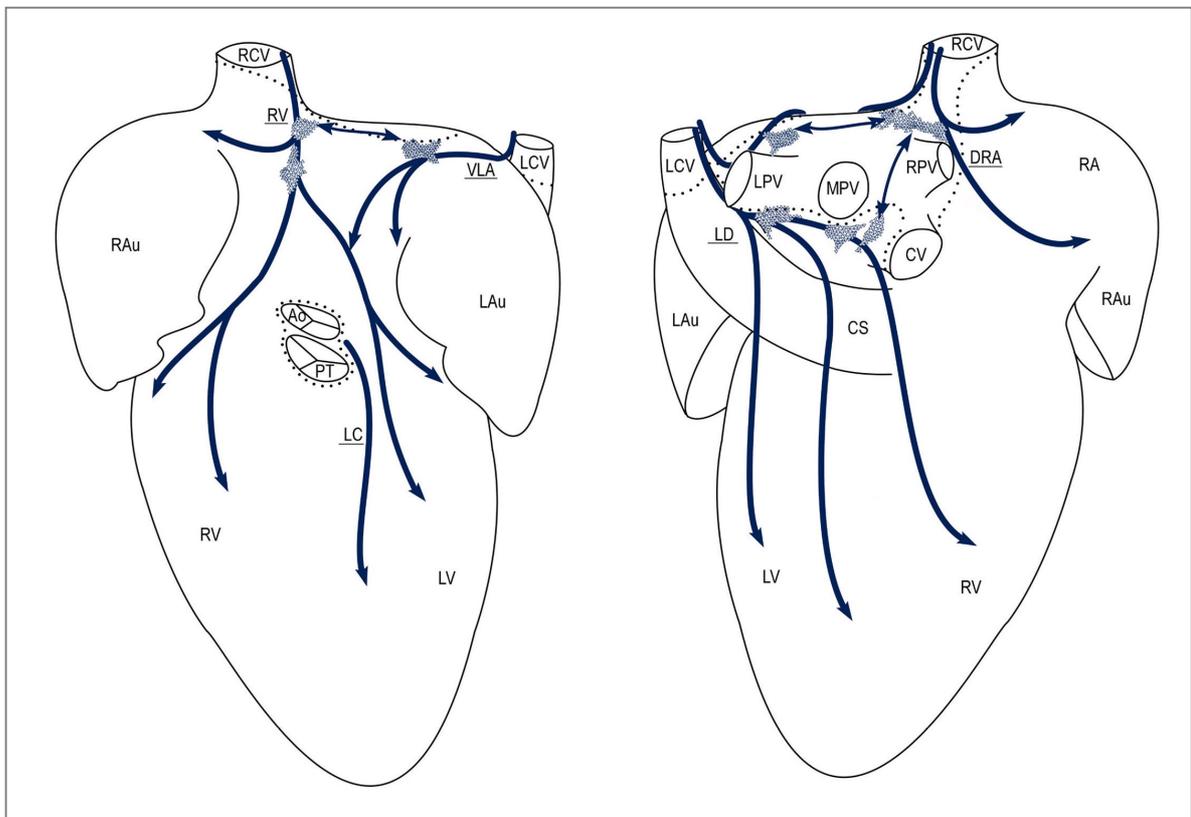


Figura 34: Ilustración del plexo cardiaco. Imagen tomada de (Rysevaite, Saburkina et al. 2011)

Tal y como refleja la figura 34, se podría generalizar que las fibras parasimpáticas se distribuyen principalmente por las regiones nodales, las aurículas y el tabique interauricular, mientras que las fibras simpáticas inervan fundamentalmente ventrículos y vasos sanguíneos (Rysevaite, Saburkina et al. 2011).

D) REGULACIÓN AUTONÓMICA DEL CORAZÓN Y SISTEMA NERVIOSO INTRÍNSECO CARDIACO

D-1: Regulación autonómica del corazón

La regulación autonómica del corazón se produce gracias a las interacciones existentes entre el sistema simpático y parasimpático, estableciéndose, a través de sus neurotransmisores, el control de las funciones globales del aparato circulatorio. Estas funciones serían: la presión sanguínea, la redistribución del flujo sanguíneo, la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción del corazón. Pero además, en las últimas décadas numerosos estudios demuestran que existe una complejidad superior del proceso de regulación vegetativa cardíaca habiéndose descrito un Sistema Nervioso Intrínseco Cardíaco, que podría funcionar incluso de forma independiente. Este tema será desarrollado en el próximo apartado. A continuación, se desarrolla un resumen de las interacciones sinápticas a nivel cardíaco según la “visión clásica” del papel del Sistema Nervioso Autónomo en la regulación cardiovascular (Kandel, Schwartz et al. 2000) (Hall and Guyton 2011).

La acción del sistema parasimpático se ejerce a través del neurotransmisor acetilcolina (ACh) que actúa sobre los receptores muscarínicos. Esta interacción provoca una disminución de la conductancia de los canales de calcio y un aumento en los de potasio lo que lleva a una hiperpolarización de la membrana, que en las células del tejido nodal provoca una disminución de la frecuencia de generación de potencial de acción nodal y por tanto, una disminución de la frecuencia cardíaca. Por tanto, el SNPs ejerce un control cronotrope negativo sobre el corazón (Kandel, Schwartz et al. 2000).

El sistema simpático, por su parte actúa a través de la noradrenalina que al interaccionar sobre los receptores beta adrenérgicos del corazón, provoca una disminución de la conductancia de los canales de potasio y un aumento en los de sodio y calcio. Esto se produce gracias al aumento de la concentración intracelular de AMPc y provoca una mayor despolarización de las membranas celulares del tejido nodal aumentado, por consiguiente, la frecuencia cardíaca. El sistema nervioso simpático ejerce así un control cronotrópico positivo.

Dada la proximidad anatómica que existe entre las divisiones simpáticas y parasimpáticas, los neurotransmisores liberados de una división del SNA influyen en la liberación o actuación de los neurotransmisores de las terminaciones nerviosas de la otra división (Marron, Wharton et al. 1995), (Florea and Cohn 2014). Al igual que en el resto del Sistema Nervioso, se producen interacciones de tipo homotrópico, heterotrópico y presinápticas. Un dato característico de estas interacciones es que los efectos vagales tienden a predominar sobre los efectos simpáticos cuando ambos se estimulan a la vez, sobre todo en lo referente a la frecuencia cardíaca (Yang and Levy 1992). Así, en condiciones de reposo, domina el tono vagal lo que permite a un individuo sano en reposo tener una frecuencia cardíaca de sesenta latidos por minuto, garantizando así una elevada capacidad de respuesta del corazón (Yang and Levy 1993). Por su parte, la actividad simpática tiene una acción más duradera y cuando su estímulo precede al vagal la predominancia vagal disminuye. Esto es debido a que los efectos de la acetilcolina son menos duraderos, ya que su inactivación por medio de la enzima acetilcolinesterasa es más rápida que la inactivación de la noradrenalina. Pero las interacciones entre el sistema nervioso simpático y parasimpático no dependen exclusivamente de las distintas duraciones de acción de los neurotransmisores clásicos. Además la liberación de un neurotransmisor estimula la producción de otras sustancias (neurotransmisor, neuromodulador, cotransmisor...) que influirá en la liberación o inactivación de otro neurotransmisor

D-2: Sistema autonómico intrínseco cardíaco.

En los últimos años se han desarrollado numerosos estudios que hablan de una complejidad superior del proceso de regulación vegetativa cardíaca. Existen cientos de ganglios intracardíacos que no sólo son simples estaciones de relevo de las fibras simpáticas y parasimpáticas sino que, junto con las miles de neuronas intracardíacas y con la participación de numerosos neurotransmisores y neuromoduladores constituyen el ya denominado Sistema Nervioso Cardíaco Intrínseco (Abboud 1996), (Armour, Murphy et al. 1997).

Así el tejido nervioso intrínseco cardíaco constituye una estructura de control que cuenta con los tres sectores anatómicos y funcionales esenciales para

funcionamiento del sistema nervioso: aferente, intercalado o de asociación y eferente (Armour and Ardell 2004), (Armour 2008).

En el Sistema Nervioso Intrínseco Cardíaco (SNIC) se han identificado neuronas en ganglios cardíacos que emiten axones solamente a otras neuronas dentro del mismo ganglio, otras que proyectan axones a neuronas de otros ganglios intratorácicos y otras a neuronas centrales. Además muchos circuitos de neuronas intratorácicas reciben entradas desde fuentes extratorácicas.

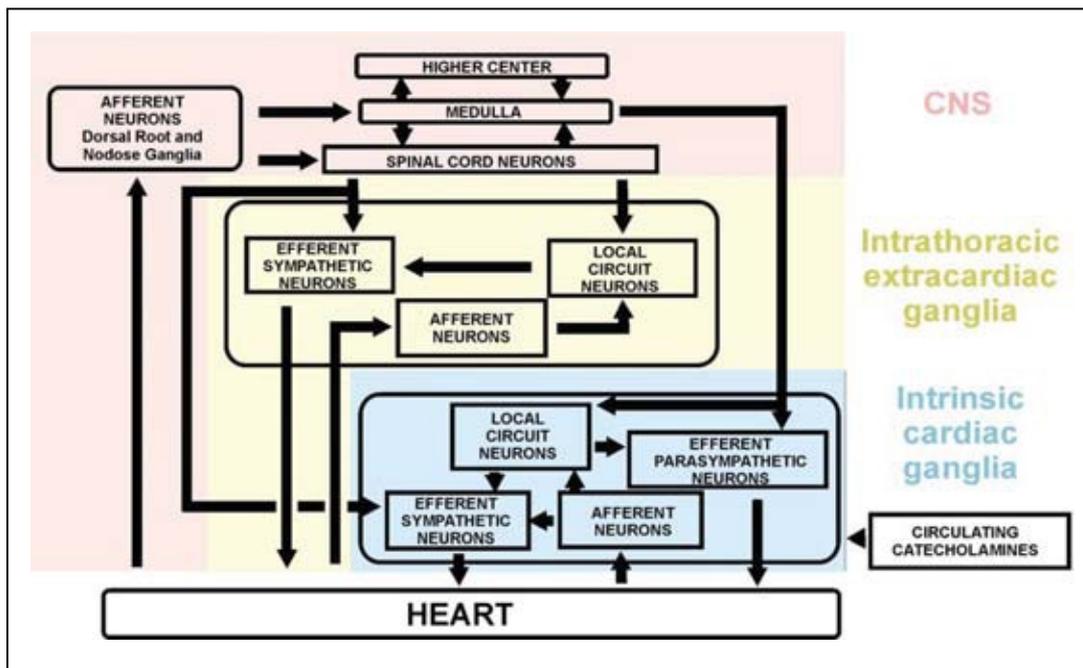


Figura 35: Modelo propuesto por Armour que incluye el sistema nervioso central (CNS) y el sistema intrínseco cardíaco, enfatizando en el componente intratorácico. Imagen tomada de (Armour 2008)

El estudio y descripción de estos ganglios intrínsecos ha sido el objeto de numerosas publicaciones en las últimas décadas (Huang, Friend et al. 1996), (Rysevaite, Saburkina et al. 2011).

Además se han identificado un conjunto de péptidos que actúan como neurotransmisores o neuromoduladores en el corazón (Corr 1992), (Crick, Wharton et al. 1994):

- El péptido intestinal vasoactivo (Weihe, Reinecke et al. 1984)
- El neuropéptido Y (Warner and Levy 1989), (Lundberg, Franco-Cereceda et al. 1990)

- La adenosina
- La sustancia P (Dalsgaard, Franco-Cereceda et al. 1986), (Zhu and Dey 1992)
- La calcitonina (Lundberg, Franco-Cereceda et al. 1985)

Se han observado receptores específicos en las neuronas del SNIC de tipo neurokinina 1 (RNK1), neurokinina 2 (RNK2) y neurokinina 3 (RNK3) para las taquicininas. También receptores purinérgicos P1 y P2 sensibles a ATP y receptores para la adenosina A1. También se han descrito otros neurotransmisores en el SNIC, tales como el óxido nítrico (Yaoita, Sato et al. 1994), (Sosunov, Hassall et al. 1996), (Steele and Choate 1994), la butirilcolina, la tirosina, la histamina y las endotelinas. Existen así, receptores H1 para la histamina y receptores ETa y ETb sensibles a las endotelinas (Izrailtyan and Kresh 1997), (Horackova, Huang et al. 1994, Horackova, Armour et al. 1995).

Por otra parte, se ha descubierto la presencia de neuronas intrínsecas con actividad adrenérgica en el SNIC, capaces de mantener la función cronotrópica e inotrópica cardiaca en casos de denervación extrínseca simpática (Wharton, Polak et al. 1990). Estas neuronas se encuentran ya presentes en fetos humanos cuando aún no se ha desarrollado la inervación simpática cardiaca y parecen tener un papel fundamental en el desarrollo del corazón, ya que, si no están presentes, los fetos morirán por insuficiencia cardiaca (Huang, Bahl et al. 2005). Se han descrito dos sub-poblaciones de este tipo de neuronas en el SNIC de mamíferos: unas con actividad noradrenérgica, de mayor tamaño, y otras de menor tamaño con actividad serotoninérgica y dopaminérgica (Slavíková, Kuncová et al. 2003).

Todo este complejo sistema nervioso intracardiaco junto con neuronas autónomas extracardiacas, inervan el corazón y modulan toda la actividad cardiaca tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

3. SISTEMA NERVIOSO Y COMUNICACIÓN NEURONAL

Una de las características más importantes del sistema nervioso central (SNC) es su capacidad ilimitada para la comunicación interneuronal pudiendo integrar una enorme complejidad de procesos lo que permite la manifestación de las distintas formas de conducta: pensamiento, lenguaje, movimientos, emociones y sensaciones. Así, se podría resumir que la comunicación, recepción, integración y expresión de la información son las bases fundamentales de la función del sistema nervioso.

3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Ramón y Cajal descubrió hace más de un siglo que el cerebro no era una red continua, sino que cada neurona era un elemento celular individual. Así definió que las células nerviosas, posteriormente denominadas neuronas, eran las unidades anatómicas, fisiológicas, genéticas y metabólicas del sistema nervioso, lo cual supuso una revolución en el conocimiento de este complejo sistema (Cajal 1892). En su primer trabajo donde describe este acontecimiento histórico (Cajal 1888), Cajal realiza la tinción del axón de las células estrelladas pequeñas de la capa molecular del cerebelo de las aves, cuyas colaterales acaban envolviendo el soma de la células de Purkinje, a modo de cestas o nidos (Figura 36). En esta publicación histórica de 1888 Cajal escribió: “cada célula nerviosa es un cantón fisiológico absolutamente autónomo”.

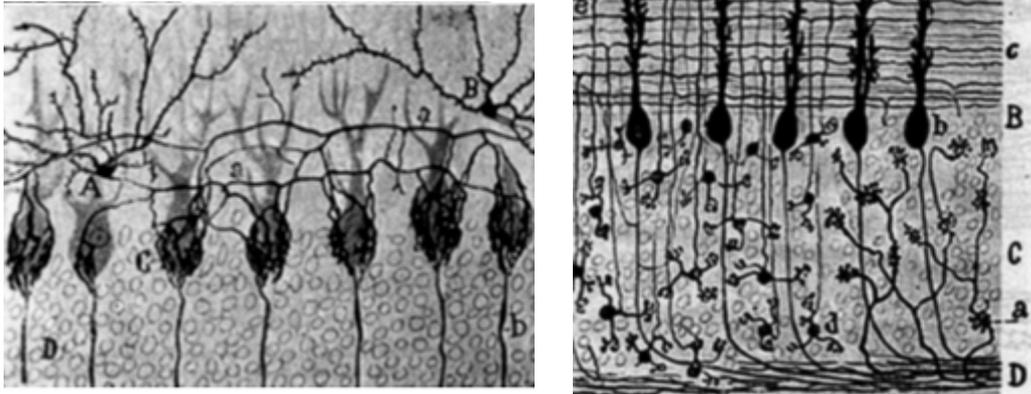


Figura 36: Dibujos originales del primer trabajo de Ramón y Cajal en el que plantea la independencia neuronal. A la izquierda: "Corte transversal de una lámina cerebelosa. A y B, células estrelladas de la capa molecular (células en cesta), cuyo axón (a) genera nidos terminales en torno de las células de Purkinje (C); b, axón de estos últimos corpúsculos". A la derecha: "Corte longitudinal de una circunvolución cerebelosa. A, capa molecular; B, capa de las células de Purkinje; C, capa de los granos; D, sustancia blanca; a, rosáceas de las fibras musgosas; b, soma de las células de Purkinje; c, fibrillas paralelas. Imagen tomada de (Cajal 1923)

Posteriormente Sherrington proporcionó más detalles describiendo el concepto de sinapsis (Sherrington 1906). Demostró que las neuronas se comunicaban con otras neuronas por contacto en las zonas sinápticas y describió la existencia de mediadores que permitían esa transmisión. Desde entonces, la mayor parte de los esfuerzos de los investigadores se han centrado en comprender las bases moleculares en las que se basan la transmisión de la información a través de esas uniones interneuronales.

En la actualidad se sabe que el SNC contiene miles de millones de neuronas que ofrecen una inmensa cantidad de posibilidades de formación de complejas redes de comunicación. El avance en técnicas electrofisiológicas, de imagen y de biología molecular ha permitido profundizar en la comprensión de la química, la fisiología y la morfología del sistema nervioso.

3.2 ELEMENTOS DE LA COMUNICACIÓN INTERNEURONAL

La comunicación interneuronal se produce gracias a la transmisión sináptica que puede ser de dos formas: sinapsis eléctrica o sinapsis química. La *sinapsis eléctrica* se caracteriza por la presencia de unos canales que conducen electricidad de una célula a la siguiente de forma directa, a través de uniones en hendidura. A través de estas uniones intercelulares comunicantes los iones pasan libremente mediando en la transferencia rápida de señales que se propagan por grandes grupos neuronales (Figura 37). Las sinapsis eléctricas son las menos frecuentes en mamíferos. En la especie humana, la comunicación se ejecuta mayoritariamente mediante la *transmisión química*. En un terminal axónico aparecen una serie de ramas con unas pequeñas regiones dilatadas llamadas terminales o botones sinápticos. El botón sináptico se apone a una estructura postsináptica adyacente, dendritas o somas, dejando un espacio de 200 a 300 angstroms, denominado hendidura sináptica. Los botones sinápticos contienen orgánulos diversos, entre ellos numerosas mitocondrias, y muestran una conglomeración de vesículas sinápticas esferoidales, que contienen un neurotransmisor químico. Un impulso eléctrico en el axón presináptico induce la secreción del neurotransmisor que difunde a través de la hendidura sináptica, se une a receptores de la neurona postsináptica y modifica la permeabilidad de la membrana para ciertos iones, provocando una respuesta excitadora (secundaria a despolarización celular) o inhibidora (secundaria a hiperpolarización celular). La transmisión de las señales en la sinapsis química es unidireccional desde el terminal presináptico hasta el soma o la dendrita postsináptica. (Figura 38).

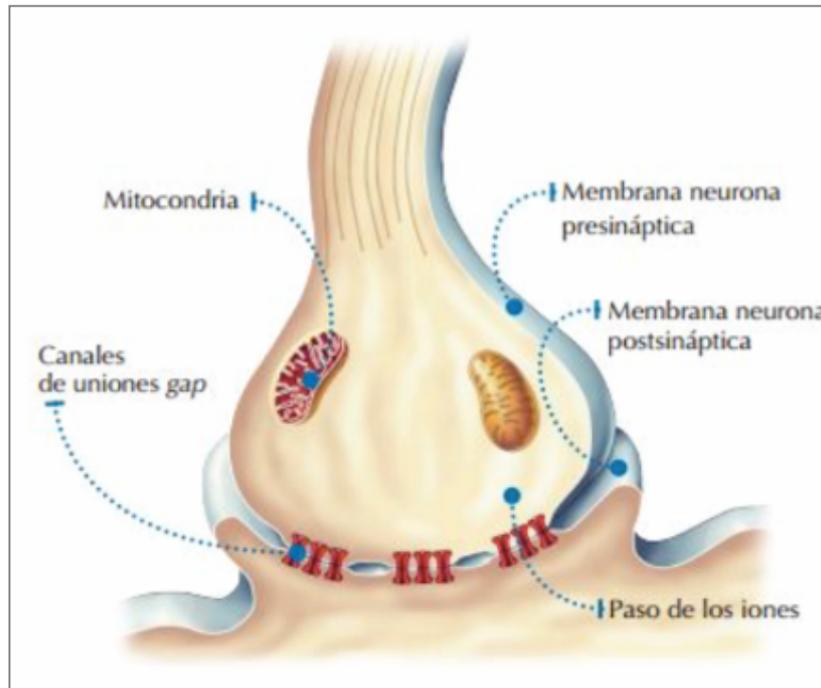


Figura 37: Representación esquemática de una sinapsis eléctrica. Imagen tomada de (Barrett 2012)

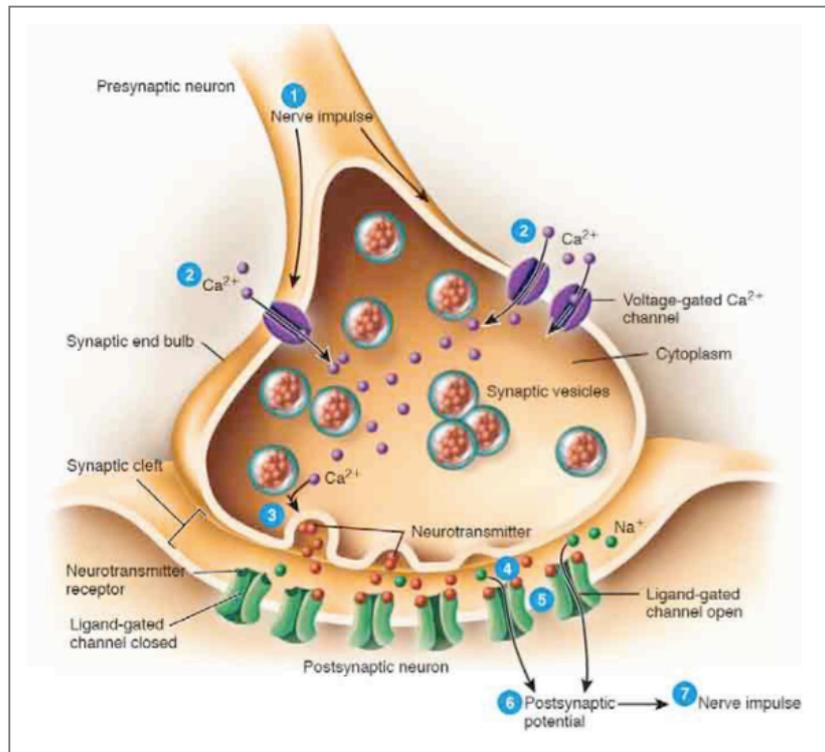


Figura 38: Representación esquemática de una sinapsis química. Imagen tomada de (Tortora and Derrickson 2014)

A continuación se describirán los distintos elementos y conceptos que intervienen en esta comunicación, no sin antes resaltar la dificultad, cada vez mayor, en delimitar con exactitud lo que se entiende por un neurotransmisor propiamente dicho, un neuromodulador o un neurorregulador. Aunque se hará referencia a los diversos modelos y a las aportaciones de los científicos más relevantes hasta el momento actual, más que marcar diferencias, que en ocasiones son arbitrarias, se resumirán incidiendo en las coincidencias.

3.2.1 Neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona

El concepto de neurotransmisor comenzó con Otto Loewi a principios del siglo XX al demostrar la liberación de acetilcolina (ACh) de los terminales nerviosos del nervio vago en el corazón. Este descubrimiento se produjo en el año 1921 a través de un experimento cuyo diseño se fraguó en un sueño y gracias al cual recibiría, posteriormente un Premio Nobel (Loewi 1921).

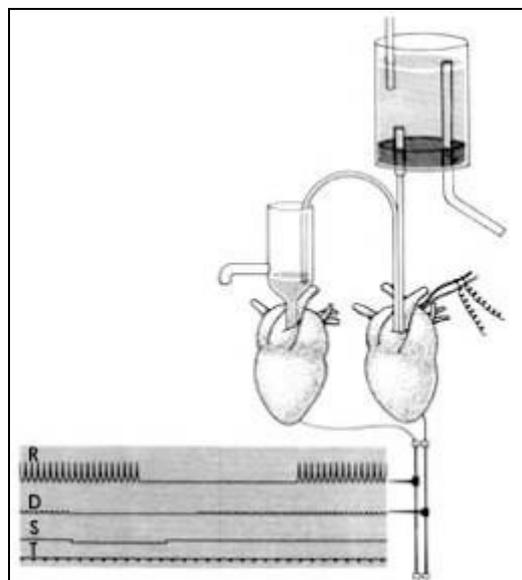


Figura 39: Dispositivo experimental utilizado por Otto Loewi para demostrar la existencia de un neurotransmisor, en este caso la acetilcolina, que reduce la contracción cardiaca. Imagen modificada de (Loewi 1953)

Él mismo relató el suceso años más tarde:

“En la noche de Sábado de Pascua de 1921 me desperté encendí la luz y garabateé unas breves líneas, el esbozo de un experimento, en un trozo de papel. Después me volví a dormir. A las seis de la mañana recordé haber escrito algo muy importante me levanté pero fui incapaz de descifrar los garabatos. El domingo fue el día más desesperado de toda mi vida científica. Sin embargo, durante la noche siguiente me desperté otra vez a las tres en punto y recordé de qué se trataba. Esta vez quise evitar cualquier riesgo y me levanté inmediatamente, fui al laboratorio hice el experimento con el corazón de una rana que ya había descrito antes y a las cinco en punto la transmisión química del impulso nervioso estaba probada de forma concluyente.

(Loewi 1953)

El experimento consistió en perfundir el corazón de una rana manteniendo una parte del nervio vago unida al mismo. Tras estimulación eléctrica del nervio, el corazón latió con más lentitud. Recogió el líquido de perfusión y lo aplicó al corazón de otra rana observando que también latía más lentamente. Con ello demostraba que el nervio vago liberaba unas sustancias en el nivel de la sinapsis parasimpática del primer corazón, que provocaban una respuesta idéntica en la musculatura del segundo corazón. Llamó a esta sustancia *Vagusstoff* o “sustancia vagal”. Más tarde se comprobó que se trataba de la acetilcolina.

También Henry Dale demostró que la ACh actuaba en los terminales nerviosos motores voluntarios para iniciar la contracción muscular. La ACh se convirtió así en la primera sustancia neurotransmisora identificada. A ella le siguió la noradrenalina y a ésta la dopamina, adrenalina, histamina, 5-hidroxitriptamina, glicina, glutamato, y aspartato.

En términos generales se define **NEUROTRANSMISOR (NT)** como la sustancia liberada en la hendidura sináptica por una neurona que actúa de forma específica sobre otra célula (neurona u órgano efector) por unión a los receptores pre o postsinápticos situados próximos al punto de liberación (Schwartz 1985).

Los requisitos para que una sustancia sea considerada como NT, según Gainer y Brownstein son (Siegel 1981):

1. Anatómicos: Presencia de la sustancia en cantidades apropiadas en los terminales presinápticos.
2. Bioquímicos: Existencia de enzimas que sintetizan la sustancia en la neurona presináptica y en los terminales.
3. Fisiológicos: La estimulación nerviosa fisiológica debe provocar la liberación de la sustancia en la terminación presináptica.
4. Farmacológicas: Las drogas que afecten a los distintos pasos enzimáticos tienen sus efectos esperados sobre la síntesis, almacenamiento, liberación, acción, inactivación y recaptación de la sustancia.

Otros autores como Bradford formulan estos criterios así (Bradford 1988):

1. La sustancia debe estar presente en las neuronas a partir de las cuales es liberada.
2. En las neuronas deben existir enzimas capaces de sintetizar la sustancia.
3. Existencia de precursores y otros compuestos que formen parte de la ruta de biosíntesis.
4. La liberación dependiente del calcio de la sustancia a los líquidos extracelulares, ha de tener lugar durante la descarga del potencial de acción por la neurona o durante la despolarización local desde sus terminales axonales.
5. El tejido próximo a la neurona en cuestión posee mecanismos para la inactivación de la sustancia, una vez que ésta ha sido liberada.
6. La sustancia imita exactamente la acción postsináptica del NT liberado en la hendidura sináptica cuando se pone en contacto con la sinapsis. La aplicación del posible NT a las neuronas postsinápticas debe duplicar el efecto de los acontecimientos observados en estado natural: por

ejemplo, un NT debe cambiar la permeabilidad de la membrana postsináptica frente a determinados tipos de iones.

7. Los agentes farmacológicos, tales como los antagonistas, que interactúan con el NT liberado, interactúan también, y de forma idéntica, con la sustancia añadida.
8. En la región tisular que contiene la sinapsis han de demostrarse receptores específicos para la sustancia neurotransmisora.

Según Orrego, para considerar que una sustancia sea considerada como verdadero neurotransmisor debía cumplir los siguientes criterios (Orrego 1979):

Criterios primarios:

1. Localización de la sustancia en vesículas dentro de las neuronas.
2. Liberación durante la estimulación eléctrica.
3. Acción semejante a la obtenida tras estimulación de la vía nerviosa en cuestión cuando la sustancia se aplica localmente.

Criterios secundarios:

1. Antagonismo farmacológico.
2. Existencia de un sistema de biosíntesis.
3. Distribución diferencial.

Existen una serie de sustancias, de bajo peso molecular consideradas por la mayoría de los autores como neurotransmisores y que se exponen en la tabla 1.

NEUROTRANSMISORES CLÁSICOS, DE MOLÉCULA PEQUEÑA O DE ACCIÓN RÁPIDA	
CLASE I	Acetilcolina
CLASE II: AMINAS	Noradrenalina
	Adrenalina
	Dopamina
	Serotonina
	Histamina
CLASE III: AMINOÁCIDOS	Ácido-aminobutírico (GABA)
	Glicina
	Glutamato
	Aspartato
CLASE IV	Óxido Nítrico (NO)

Tabla 1: Neurotransmisores clásicos o de acción rápida.

Tabla modificada de (Hall and Guyton 2011)

Además de los neurotransmisores, pronto se definieron una serie de sustancias funcionalmente distintas denominadas NEUROMODULADORES que se liberan a partir de una sinapsis o varicosidad nerviosa actuando a nivel postsináptico local o a distancia, modificando la acción del neurotransmisor. No llevan a cabo una acción postsináptica directa sino que regulan la acción del neurotransmisor ampliando o atenuando su efecto (Burnstock 1985), (Ciarleglio, Beinfeld et al. 1993). Un ejemplo de neuromodulación lo constituye el sistema de benzodiazepinas, al interactuar con los receptores GABA postsinápticos. Al liberarse juntos, GABA y benzodiazepinas, éstas actúan en algún punto del receptor postsináptico donde actúa GABA y son capaces de aumentar el paso del ion cloro iniciado por GABA ejerciendo un efecto de refuerzo sobre la acción de aquella sustancia (Bradford 1988).

Por último, existen otro tipo de sustancias llamadas NEUROHORMONAS que, tras ser liberadas al torrente sanguíneo desde su lugar de síntesis, son

transportadas hasta las células sobre las que actúan ejerciendo su acción sobre determinados receptores (Burnstock 1985).

3.2-2 NEUROPEPTIDOS

En 1967 se utiliza por primera vez el término de “neurona peptidérgica” para designar a las neuronas que sintetizaban los octapéptidos oxitocina y vasopresina (Bargmann and von Gaudecker 1969). Vincent du Vigneaud, bioquímico estadounidense galardonado con el Premio Nobel de Química en 1955, fue quien, en 1953 descubrió que la oxitocina era un péptido corto que contenía 9 residuos de aminoácidos (Du Vigneaud 1969). A partir de esta década se continuaron aislando una serie de sustancias que tenían la capacidad de participar en la transmisión del impulso nervioso. Así tras el descubrimiento del origen neuronal de la secreción de vasopresina y oxitocina, y de las hormonas hipofisarias, se abrió el camino para la aceptación de que ciertas sustancias peptídicas podrían comportarse como elementos de comunicación neuronal (Krieger 1986).

Hoy día se sabe que los neuropéptidos (NP) son un grupo de neurotransmisores ampliamente presentes en todo el reino animal. Son sustancias neuroactivas muy potentes capaces de activar receptores a concentraciones mucho más bajas que los NT clásicos y tienen una estructura química diferente. Las diferencias entre ambos se sintetizan en la tabla 2 (Reichelt and Edminson 1976), (Hökfelt, Johansson et al. 1980). Su distribución en el SNC, detectada tanto mediante técnicas de radioinmunoanálisis e inmunocitoquímicas como mediante el estudio de sus receptores específicos, demuestra una alta especificidad para cada neuropéptido en su localización y en el patrón de arborización. Su concentración es muy pequeña (entre 10^3 y 10^5 veces menor que la de monoaminas) pero la afinidad por sus receptores es muchísimo mayor.

	NT CLÁSICOS	NEUROPEPTIDOS
CONCENTRACIÓN MEDIA	ALTA	EXTREMADAMENTE BAJA
UNIÓN A RECEPTORES	ALTA AFINIDAD	BAJA AFINIDAD
POTENCIA	BAJA	MUY ALTA
ESPECIFICIDAD	GRANDE	GRANDE
VELOCIDAD DE SÍNTESIS	MODERADA	BAJA
TAMAÑO DE MOLÉCULA	PEQUEÑO (2-10 CARBONOS)	PEQUEÑO-MEDIO (2-100 CARBONOS)

Tabla 2: Características y diferencias entre neurotransmisores y neuropéptidos.

Tabla modificada de (Reichelt and Edminson 1976).

El número de péptidos identificados en el SNC de mamíferos continúa creciendo en la actualidad y existen diferentes clasificaciones. En la tabla 3 se exponen los principales. Existe un creciente el número de péptidos de los que se ha conseguido sintetizar análogos agonistas y antagonistas, algunos incluso de naturaleza no peptídica, que están permitiendo profundizar en sus acciones celulares y fisiológicas.

<p>HIPOTALÁMICOS</p> <p>Hormona liberadora de tirotropina (TRH) Somatostatina (SS) Hormona liberadora de corticotropina (CRH) Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) Orexinas A y B (hipocretinas 1 y 2)</p> <p>HIPOFISARIOS</p> <p>Vasopresina Oxitocina Hormona adrenocorticotropa (ACTH) Hormona estimuladora de melanocitos Prolactina Hormona de crecimiento (GH) Hormona estimulante del foliculo (FSH) Hormona luteinizante (LH) Hormona estimulante del tiroides Secretoneurina</p> <p>PÉPTIDOS GASTROINTESTINALES Y PANCREÁTICOS</p> <p>Péptido intestinal vasoactivo (VIP) Colecistocinina (CCK) Gastrina Insulina Glucagón Motilina Amilina Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) Galanina Secretina Neuropéptido Y Polipéptido pancreático Péptido tirosina-tirosina</p>	<p>PÉPTIDOS OPIOIDES</p> <p>Metencefalina (Met-Enk) Leu-encefalina (Leu-Enk) Dinorfina β-endorfina</p> <p>TAQUICININAS</p> <p>Sustancia P Neurokinina A (Sustancia K) Neurokinina B Neuropéptido K</p> <p>OTROS</p> <p>Angiotensina II Bombesina Bradicinina Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) Neurotensina Neuropéptido FF Péptido natriurético cerebral</p> <p>NUEVOS</p> <p>Péptido regulador de la cocaína y anfetaminas Endomorfina 1 y 2 Nociceptina/Orfanina Nocistatin Péptido liberador de prolactina Urocortina Cortistatina Apelina</p>
---	---

Tabla 3. Clasificación de los principales neuropéptidos de mamíferos (resaltado el grupo de taquicininas, objeto de estudio de este trabajo) Tomado de (García-López, Martínez-Martos et al. 2002)

Las propiedades bioquímicas y fisiológicas de los neuropéptidos también difieren de las de los neurotransmisores clásicos en varios aspectos:

- SÍNTESIS

A diferencia de las monoaminas, por ejemplo, que se sintetizan en las terminaciones y varicosidades axónicas, los neuropéptidos siguen el patrón descrito para las hormonas proteicas y otras proteínas secretoras. Así, el proceso comienza con la síntesis de *pre-propéptidos* en los ribosomas del cuerpo neuronal,

producto del gen específico del neuropéptido. Este prepropéptido constituido por una secuencia de 15-30 aminoácidos, será escindido por una metaloendopeptidasa en la membrana del retículo endoplasmático rugoso del soma formándose así la *proproteína o propéptido*. Ésta es vehiculizada al aparato de Golgi donde se va acumulando en gránulos secretores o vesículas densas que se liberan al citoplasma para ser transportadas por el axón hacia el extremo de la neurona. A lo largo de este proceso de transporte y almacenamiento granular, la proproteína sufre modificaciones estructurales mediante enzimas específicas. Primero una de tipo endopeptidasa y posteriormente otra de tipo carboxipeptidasa escinden los propéptidos a nivel de parejas de aminoácidos básicos que flanquean secuencias péptidos que han de ser separadas para dar lugar a los neuropéptidos activos. También existen lugares donde se realizan otras modificaciones como acetilación del residuo amino-terminal, glicosilación y amidación del residuo carboxiterminal que dan como resultado la activación o inactivación de los precursores (Bradford 1988). No existe síntesis local a nivel de los terminales nerviosos (Hökfelt, Johansson et al. 1980).

La actividad y la especificidad de las endopeptidasas y carboxipeptidasas son factores importantes porque de ellas depende la velocidad, la cantidad y el tipo de neuropéptidos. Así algunas de estas enzimas son específicas de toda una familia de neuropéptidos, mientras que otras son inespecíficas. Por ejemplo, la carboxipeptidasa E es específica de la síntesis de encefalina, mientras la carboxipeptidasa B procesa distintos tipos de neuropéptidos. Además, algunos propéptidos pueden dar lugar a varios neuropéptidos activos y dependiendo de qué enzima sea la que actúe sobre el propéptido, variará la cantidad o incluso la naturaleza del mismo. Así, el que exista un neuropéptido u otro en un tejido determinado depende de la distribución de los enzimas existentes en las células nerviosas de dicha región. Por otra parte, dependiendo del número de aminoácidos que acompañen al núcleo fundamental de un neuropéptido varía su afinidad por el receptor y, por tanto, su actividad (Benjannet, Seidah et al. 1980), (Tremblay, Tretjakoff et al. 1988), (Zakarian and Smyth 1979).

Con todo lo expuesto anteriormente se pone de manifiesto que, en la comunicación interneuronal mediante neuropéptidos, las enzimas responsables de

su procesamiento juegan un papel fundamental. Aunque esta dotación enzimática está genéticamente controlada, su expresión puede estar sometida a sistemas de regulación dependientes de señales aferentes, es decir, que en función de cuál sea la señal, puede cambiar el tipo de información codificada en el neuropéptido particular que se libere. Además, si la neurona tiene capacidad para liberar varios neuropéptidos, cabe pensar que pueda emitirlos de forma selectiva por distintas terminaciones. Por todo ello parece que una neurona neuropeptídica dispone de mecanismos de comunicación mucho más complejos que la neurona monoamínica, que sólo podría realizar variaciones cuantitativas.

- ALMACENAMIENTO

La presencia y almacenamiento de los NT clásicos en las terminaciones nerviosas se produce por:

1. Síntesis enzimática en las mismas terminaciones.
2. Recaptación desde el espacio extraneuronal (espacio sináptico).
3. Almacenamiento en vesículas que son transportadas axonalmente desde el cuerpo neuronal.

Sin embargo, los neuropéptidos no se sintetizan en las terminaciones nerviosas y tampoco son recaptados desde la hendidura sináptica. Como se ha explicado anteriormente, los neuropéptidos se encuentran en las terminaciones nerviosas en forma de vesículas que son sintetizadas en el cuerpo neuronal y que alcanzan la terminación por transporte axonal (Hökfelt, Johansson et al. 1980).

En las terminales nerviosas, por tanto, existen al menos dos tipos de vesículas:

- a) La vesícula sináptica que contiene transmisores clásicos, de 500 Å de diámetro aproximado.
- b) La vesícula grande, de alrededor 1000 Å de diámetro que contiene un núcleo denso y es llamada vesícula “grande de núcleo denso” o “granular”.

Mediante estudios inmunohistoquímicos a nivel ultraestructural, se ha demostrado que los neuropéptidos están localizados en las vesículas grandes de

núcleo denso coexistiendo con transmisores clásicos. Así, en 1981 Pelletier demostró que la sustancia P está presente en las vesículas grandes de núcleo denso de las terminaciones nerviosas del asta dorsal de la médula espinal (Pelletier, Steinbusch et al. 1981).

- INACTIVACIÓN

Los mecanismos para hacer desaparecer al neurotransmisor clásico del espacio sináptico son tres: difusión, degradación enzimática y recaptación. Sin embargo, el principal mecanismo propuesto para la inactivación de neuropéptidos es la degradación enzimática por peptidasas extracelulares (Kandel 2013). Por tanto, la tasa de eliminación de los neuropéptidos es mucho más lenta, siendo su metabolismo semejante al de las hormonas y su acción mucho más duradera que la de los NT clásicos (Lynch and Snyder 1986).

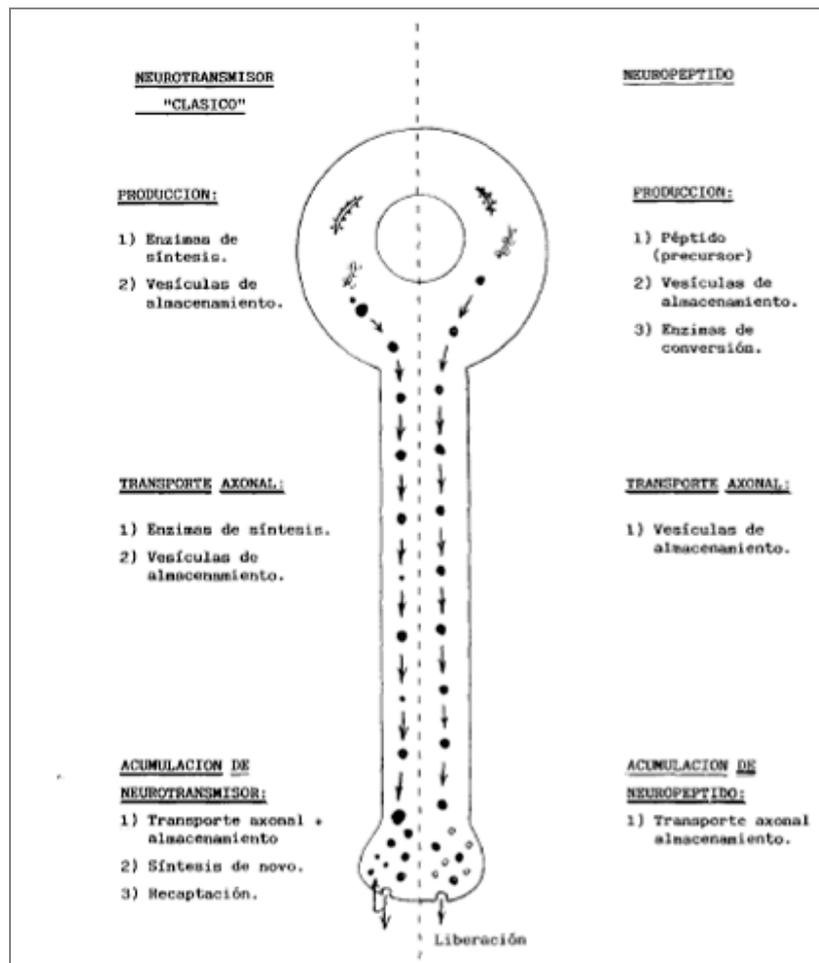


Figura 40: Representación esquemática de la síntesis y liberación de neuropéptidos y neurotransmisores. Ver explicación en el texto. Imagen tomada de (Hökfelt, Johansson et al. 1980)

3.2-3 RECEPTORES

Todas las posibilidades de expresión de una neurona quedarían anuladas si no encuentra, en la neurona postsináptica las moléculas receptoras adecuadas. El descubrimiento de neurotransmisores y nuevos péptidos conlleva la búsqueda de los receptores que los reconocen pues éstos adquieren una crucial importancia en el estudio de la neurofarmacología. Así, gran parte de los fármacos que se están desarrollando en la actualidad actúan interaccionando con dichos receptores. Por otra parte, pequeñas modificaciones en la naturaleza de un transmisor (por ejemplo, modificaciones en la longitud de un neuropéptido), implican grandes cambios en la afinidad por un subtipo determinado, con lo que cambia el receptor activado y, por consiguiente, la función ejecutada. Este es, por tanto, otro mecanismo que posee la neurona para modular su actividad.

La combinación de técnicas de genética molecular, de radioligandos y el uso creciente de fármacos agonistas y antagonistas cada vez más selectivos, ha permitido identificar con claridad subtipos de receptores para noradrenalina (α_1 , α_2 , β_1 , β_2), acetilcolina (muscarínicos M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5 ; nicotínicos neuronales y neuromusculares), dopamina (D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , D_5), GABA (GABA_A, GABA_B), glutamato (NMDA, kainato), pruriginérgicos o serotonina. La mayoría de ellos pertenecen a la macrofamilia de receptores acoplados a proteínas G. De los receptores de serotonina, el receptor 5-HT₃ es el único que se encuentra asociado a un canal iónico

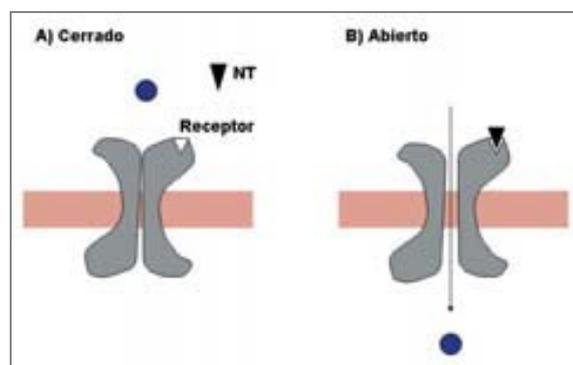


Figura 41: Receptor ionotrópico. A) Cerrado. B) Apertura del receptor tras la unión de un neurotransmisor. A esta familia de receptores, que median respuestas celulares rápidas, pertenecen los receptores nicotínicos, GABA, glicina, glutamato, NMDA, AMPA y 5-HT₃. Imagen tomada de (Eguiagaray, Egea et al. 2004)

Respecto a los neuropéptidos, prácticamente todos los receptores descritos hasta el momento son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G.

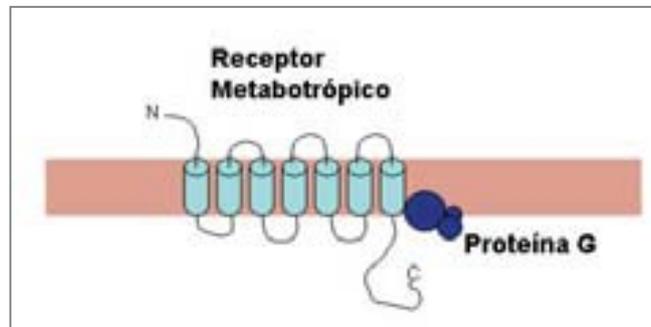


Figura 42: Esquema ilustrativo de un receptor metabotrópico de siete dominios transmembrana acoplado a proteína G. Imagen tomada de (Eguiagaray, Egea et al. 2004)

Estos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) están formados por una cadena única de 400 a 600 residuos de aminoácidos. Contienen un lugar de reconocimiento para el ligando y un lugar de reconocimiento para una proteína G particular. Estructuralmente presentan siete tramos transmembrana constituidos por 22-28 residuos hidrófobos en forma de haces de hélices estrechamente empaquetados, separados por segmentos hidrófilos. La unión del NP a su receptor provoca la activación de la proteína G, que es la encargada de iniciar la vía efectora de la respuesta intracelular, a través de distintas moléculas que actúan como segundos mensajeros. La proteína G acoplada es un heterotrímero constituido por la subunidad α con actividad GTPasa y dos subunidades: β y γ que forman un dímero. Este dímero se desacopla de la subunidad α cuando se activa la proteína G. Existen varias isoformas de estas subunidades que dan lugar a los distintos tipos de proteínas G (Zhang, Devries et al. 2006).

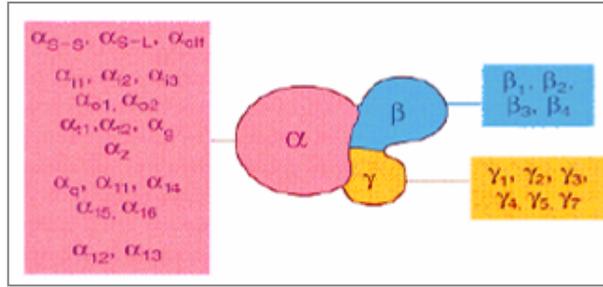
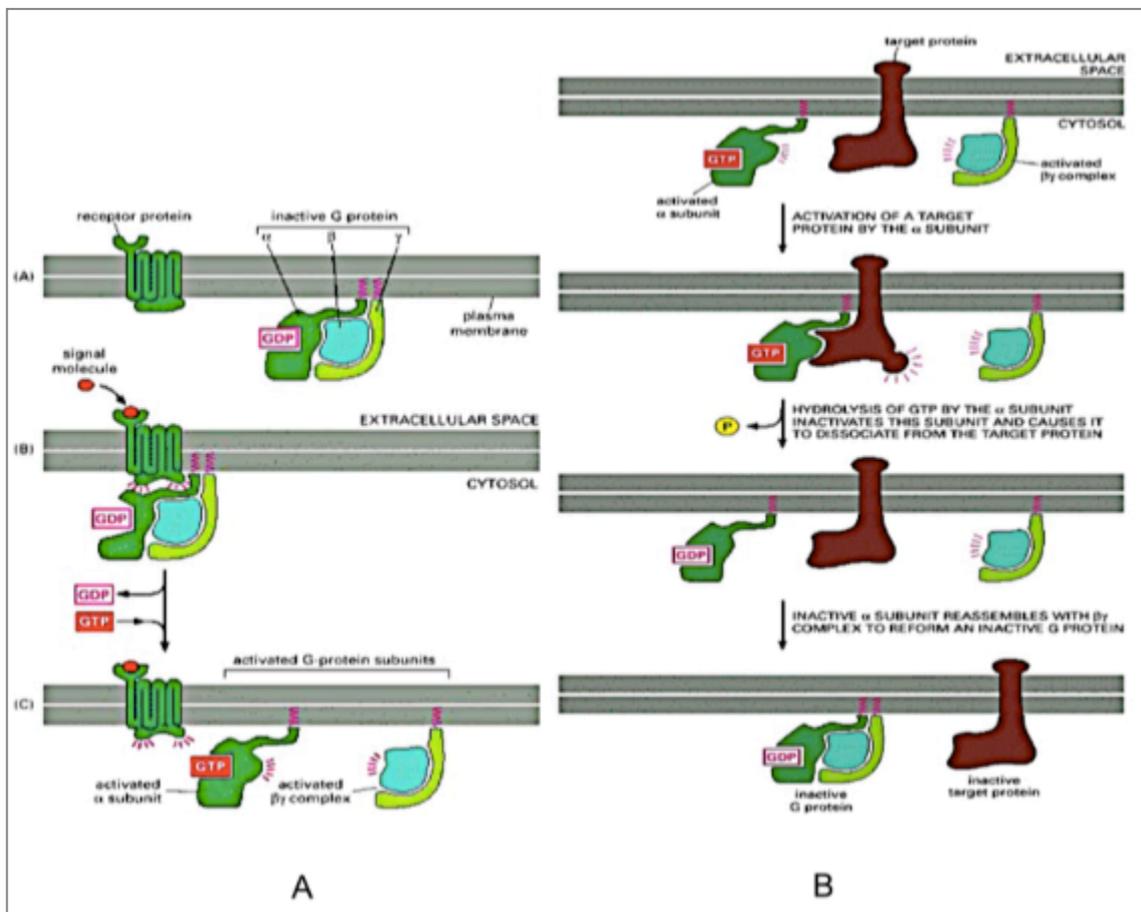


Figura 43: Diferentes combinaciones de proteína G según las isoformas de las subunidades alfa, beta y gamma. (Imagen modificada de la original de (Zhang, Berger et al. 2006))

En estado de reposo el trímero está asociado y la subunidad α está unida a guanidín difosfato (GDP). Cuando el receptor se une al ligando se producen cambios en las asas intracelulares del receptor que disocian el trímero y activan la proteína G. La subunidad α se separa del dímero β - γ y se une al GTP. Y junto con el dímero β - γ por separado pueden actuar sobre una gran gama de efectores diferentes como la adenilato ciclasa, las fosfodiesterasas, la fosfolipasa C o canales



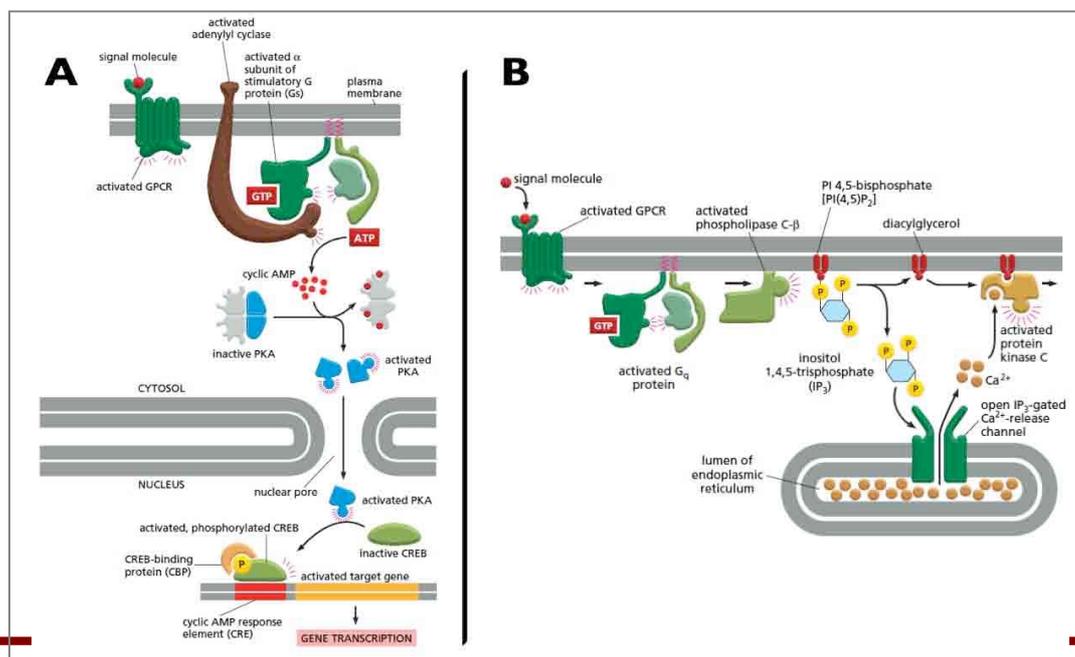
iónicos, que activan la cascada de señalización intracelular (Figura 44).

Figura 44. A. Activación de la proteína G. Tras la unión del ligando al receptor, se produce un cambio conformacional en la proteína G. La alteración de la subunidad α , permite el intercambio de GDP por GTP, lo que provoca la disociación de la proteína G en dos componentes activos: la subunidad α y el complejo β - γ , que pueden regular la actividad de proteínas diana en la membrana plasmática. B. Inactivación de la subunidad α por hidrólisis del GTP a GDP, que se disocia de la proteína diana y se une al complejo β - γ , conformando de nuevo una proteína G inactiva. Imagen tomada de (Alberts 2014)

La unión del NP a su receptor provoca la activación de la proteína G, que inicia diferentes vías efectoras de la respuesta intracelular (Figura 45):

1. Activación de la enzima adenilatociclasa, que convierte ATP en AMPc. Este AMPc se combina con una proteincinasa dependiente de adenilatociclasa: la proteinquinasa A (PKA), que consta de una subunidad reguladora y otra catalítica. La interacción del AMPc con la subunidad reguladora provoca la liberación de la unidad catalítica, que actúa sobre el ADN y produce efectos a largo plazo sobre el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular (Figura 45-A)

2. Activación de la fosfolipasa C- β (PLC- β) que produce hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato dando lugar a diacilglicerol (DAG) que activa la proteinquinasa C (PKC) y el inositol trifosfato (IP₃) que aumenta los niveles de



calcio citosólicos (Figura 45-B).

Figura 45: Vías efectoras de los receptores acoplados a proteínas G. A. Vía de la adenilatociclasa y la proteinquinasa A. B. Vía del fosfatidil inositol bifosfato. (Imagen tomada de (Alberts 2014)

El descubrimiento e identificación de los receptores de los NP pone de manifiesto que éstos pueden actuar sobre sus propias dianas celulares lo que implica que los neuropéptidos desempeñen un papel fisiológico propio. Esto ha supuesto un gran avance en la neurociencia y la farmacología actual.

3.2-4 SINAPSIS Y EFECTOS POSTSINÁPTICOS. COEXISTENCIA DE PÉPTIDOS CON NEUROTRANSMISORES CLÁSICOS

En la sinapsis química se produce una despolarización del terminal presináptico seguida de una apertura de canales de Ca^{++} voltaje dependientes que permite la entrada de este catión al interior de la neurona. La liberación de los neuropéptidos al igual que del resto de neurotransmisores es un proceso calcio dependiente. Así la entrada de Ca^{++} promueve que las vesículas que contienen los NP viertan su contenido al espacio sináptico tras fusionarse con la membrana plasmática del terminal presináptico. La diferencia con los NT clásicos es que los NP necesitan concentraciones Ca^{++} citoplasmático mucho menores para ser liberados y que, además pueden hacerlo en un lugar extrasináptico (Verhage, McMahon et al. 1991), (Thureson-Klein and Klein 1990).

Según la hipótesis enunciada por Henry Dale en 1935, cada neurona actúa a través de la liberación de una única sustancia neurotransmisora la cual define el tipo de neurona (Dale 1935). Sin embargo, mediante métodos inmunohistoquímicos se ha podido demostrar que los neuropéptidos, en muchas ocasiones, se localizan en las mismas neuronas que los NT clásicos coexistiendo con ellos y liberándose de forma conjunta (Hökfelt, Johansson et al. 1980), (Hökfelt, Millhorn et al. 1987), (Schwartz 1985). Así, por ejemplo, se observó la coexistencia de 5-HT, SP y Hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en las mismas vesículas de algunas terminaciones nerviosas de la médula espinal de diversas

especies (Johansson, Hökfelt et al. 1981). Esta nueva concepción fue denominada COEXISTENCIA y con ella se superaba el hasta entonces vigente Principio de Dale.

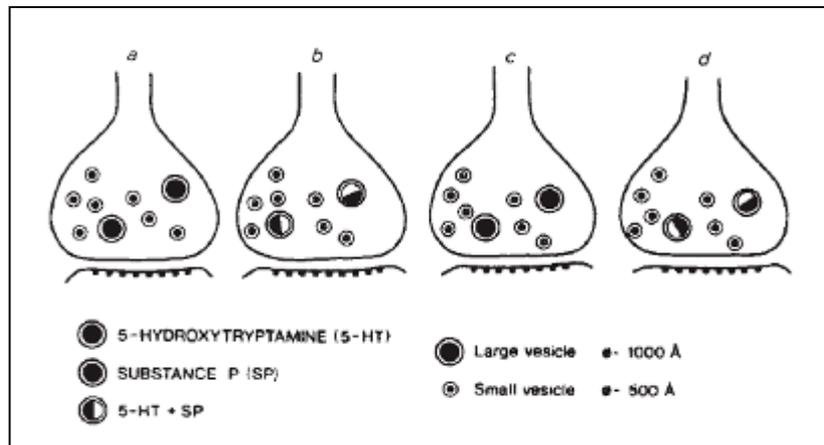


Figura 46: Ilustración que muestra cuatro posibilidades de almacenamiento de una amina (5-HT) y un péptido (SP) coexistiendo en un axón terminal (Imagen tomada de (Hökfelt, Johansson et al. 1980))

Del concepto de coexistencia deriva otro concepto más funcional: el de COTRANSMISIÓN. Se entiende por cotransmisión al proceso por el cual un neurotransmisor (peptídico o clásico) es regulado por otro neurotransmisor peptídico. Así, la interacción de un neurotransmisor no peptídico con su receptor en presencia de un neuropéptido puede:

- Provocar acciones diferentes a las que se producirían tras la interacción del neurotransmisor con su receptor en ausencia del neuropéptido.
- Interferir, positiva o negativamente, siendo modulada su acción (Hökfelt, Holets et al. 1986). Esta acción se ve favorecida por la lenta degradación y amplia difusión peptídica (Björklund, Hökfelt et al. 1992).

En las últimas décadas se han publicado numerosos ejemplos de cotransmisión neuronal en diferentes localizaciones, tanto en el SNC como en el SNP (Johansson, Hökfelt et al. 1981), (Eckenstein and Baughman 1984), (Hökfelt, Millhorn et al. 1987), (Corr 1992).

Por tanto, el concepto de que cada neurona libera una única sustancia neurotransmisora (Principio de Dale) ha sido superado. Hoy en día se sabe que cada neurona puede liberar diferentes moléculas mensajeras con diversas acciones biológicas. Además un NP puede actuar como NT en una sinapsis y también puede

ser liberado extrasinápticamente para ejercer acciones moduladoras u hormonales en otros lugares que sean receptores para él. Por todo esto, como ya expusimos al inicio de este apartado, resulta muy difícil establecer con total exactitud la función que desempeña un determinado NP (Kandel 2013), (Flórez, Armijo et al. 2013)

4 LA GRAN FAMILIA DE LAS TAQUICININAS

4.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS: DESCUBRIMIENTO DE LA SUSTANCIA P.

La sustancia P (SP) pertenece a la familia de las taquicininas y es un péptido endógeno de once aminoácidos que está presente tanto en especies mamíferas como no mamíferas. Fue la primera taquicinina descubierta y es, a día de hoy, la mejor estudiada y caracterizada en cuanto a su distribución, liberación y acciones fisiológicas en el organismo.

En 1931, Ulf Von Euler (Figura 47) y John Gaddum descubrieron, en el cerebro e intestino de caballo, la existencia de un factor resistente a la atropina que estimulaba el músculo liso y disminuía la presión sanguínea. A este compuesto lo llamaron sustancia P (de *powder*, polvo en inglés) pues observaron que mantenía su actividad cuando, tras evaporarse se convertía en polvo seco. Resulta interesante destacar que por esa época numerosos autores discutían la hipótesis de la neurotransmisión química. Sin embargo, Henry Dale, maestro de Euler, acababa de publicar la función neurotransmisora de la acetilcolina y animó a su discípulo a investigar su distribución en el tracto digestivo. Euler y Gaddum diseñaron un estudio utilizando un fragmento de intestino en un baño orgánico y, efectivamente, como resultado obtuvieron la estimulación del fragmento. Lo que llamó la atención a los jóvenes investigadores fue que al aplicar atropina, este efecto no se revirtiera del todo. Fue así, de esta forma como se pensó por primera vez y se descubrió la sustancia p (Von Euler 1931). Además de éste, Von Euler, profesor de fisiología del instituto Karolinska (Estocolmo), realizó otros importantes descubrimientos como la noradrenalina o las prostaglandinas. Sin embargo, no fue hasta 1949 cuando uno de sus discípulos, Beng Pernow obtuvo la primera purificación de la SP y amplió los datos acerca de su distribución y funciones biológicas (Pernow 1953, Von Euler and Pernow 1956, Pernow 1963). Paralelamente en 1953 en Australia, Fred Lembeck publicó sus estudios que demostraban la función neurotransmisora sensitiva de la SP (Lembeck 1953). Finalmente, a comienzos de la década de los 70 en Boston, Susan Leeman (Figura

48) y su equipo consiguieron aislar y purificar completamente la SP a partir de hipotálamo de cerebro bovino (Chang and Leeman 1970). Se decidió llamar a este conjunto de péptidos taquicininas y determinaron, por fin, su estructura química, identificándola como un undecapéptido con un peso molecular de 1347,6 g/moles (Chang, Leeman et al. 1971). Esos mismos autores fueron los primeros en sintetizar el compuesto y poner en marcha un ensayo radioinmunológico para la SP (Tregear, Niall et al. 1971). De esta forma quedaban establecidas las bases que permitirían realizar futuros estudios inmunohistoquímicos en diferentes tejidos animales.



Figura 47: Ulf Von Euler (1905-1983). Médico, farmacólogo y profesor universitario sueco galardonado con el Premio Nobel de Medicina en el año 1970. (Imagen tomada de The Nobel Foundation)



Figura 48: Susan E. Leeman (1930-). Médico endocrinóloga americana, considerada una de las fundadoras de la neuroendocrinología.

4.2 PÉPTIDOS DE LA FAMILIA DE LAS TAQUICININAS Y ESTRUCTURA GENÉTICA.

La familia de las taquicininas (TK) conforma la mayor familia peptídica descrita en el reino animal. Está compuesta por una serie de péptidos que comparten secuencias comunes de aminoácidos en la posición carboxilo terminal y una secuencia amino terminal, variable, que es la que confiere especificidad a cada subtipo (Tabla 3). La secuencia carboxilo terminal está constituida por los siguientes aminoácidos: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ siendo X un aminoácido aromático (Phe, Tyr) o un aminoácido alifático (Val, Ile) (Otsuka and Yoshioka

1993). Todas las TK son aminopéptidos, es decir, tienen un grupo amino en la metionina carboxi terminal y, aunque el extremo amino sea el que confiera especificidad, la secuencia carboxilo es la encargada de la interacción y activación del receptor al que se une la TK. Este es el motivo por el que los péptidos llamados *tachykinin-like* de los invertebrados, que tienen una arginina en el C-terminal no pueden activar los receptores taquicinérgicos de mamíferos.

La primera taquicinina, la SP, fue identificada en 1931 (Von Euler 1931) y caracterizada cuarenta años después (Chang, Leeman et al. 1971). Los siguientes miembros de la familia descritos fueron la neuroquinina A (NKA) y la neuroquinina B (NKB), identificados en mamíferos en los años 1983 y 1984 (Kimura, Okada et al. 1983), (Kangawa, Minamino et al. 1983). Posteriormente, se han sumado el neuropéptido K (NPK) (Tatemoto, Lundberg et al. 1985) y el neuropéptido gamma (NPγ) (Kage, McGregor et al. 1988) que son realmente formas extendidas del NKA. Recientemente en el año 2000 se ha identificado una nueva TK, la hemokinina-1 (HK-1) (Zhang, Lu et al. 2000), relacionada con el sistema hematopoyético, secretada por células dendríticas e involucrada en la maduración de linfocitos B (Nelson, Marriott et al. 2004), (Patacchini, Lecci et al. 2004). Este descubrimiento ha dado paso a la descripción de un nuevo grupo de TK, las endokininas (EK_s) con una estructura variable entre diferentes especies animales. Las endokininas A (EKA) y las endokininas B (EKB) son formas elongadas de la HK-1 y las endokininas C (EKC) y las endokininas D (EKD) son realmente péptidos *tachykinin-like* (Phe-X-Gly-Leu-LeuNH₂) por lo que éstos últimos no presentan afinidad por ninguno de los tres receptores taquicinérgicos.

TAQUICININAS	Nº aa	Gen	Secuencia de aminoácidos ^a
Sustancia P	11	TAC 1	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂
Neurokinina A	9	TAC 1	His-Lys-Thr-Asp-Ser- Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂
Neurokinina B	10	TAC 3	Asp-Met-His-Asp-Phe- Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂
Hemokinina 1	11	TAC 4	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂

Tabla 3: Secuencia de aminoácidos de las fundamentales taquicininas humanas. Los tres residuos comunes a todas las taquicininas se muestran en negrita y azul.

Las TK de mamíferos están codificados por tres genes diferentes denominados preprotaquicinas (TAC) de acuerdo con la *Human Genome Organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee* (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature). Esta nomenclatura sustituye a los términos usados anteriormente: preprotaquinina- A o PPT-A, preprotaquinina- B o PPT-B y preprotaquinina- C o PPT-C (Patacchini, Lecci et al. 2004).

El gen TAC 1 (Figura 49-A), clonado a partir de cerebro bovino (Nawa, Hirose et al. 1983), está constituido por siete exones. El exón 3 codifica la SP, el exón 6 la NKA. La secuencia que codifica la NPK está contenida en los exones 3, 4, 5 y 6 y por último la NP γ la contienen los exones 3, 5 y 6. Mediante *splicing* de ARN se obtienen 4 ARN mensajeros (ARNm) distintos: α -TAC1, β -TAC1, γ -TAC1 y δ -TAC1. Mientras que la SP está presente en todos los transcritos, la NKA solo está presente en β -TAC1, γ -TAC1 (Holmgren and Jensen 2001). La existencia de este *splicing* permite que la SP pueda expresarse a nivel regional de forma aislada mientras que la NKA siempre requiera estar acompañada de la expresión de SP.

Se ha comprobado la expresión de TAC1 en todos los tejidos humanos estudiados. Cerebro, corazón, bazo, colon, glándula mamaria, útero o placenta han sido algunos de los primeros ejemplos (Marzioni, Fiore et al. 2005), (Pinto, Almeida et al. 2004), (Cañete, Dorta et al. 2013) (Candenas, Lecci et al. 2005) y existen cada vez más estudios que así lo demuestran.

El gen TAC 3 codifica la NKB (Kotani, Hoshimaru et al. 1986). Este gen está compuesto por siete exones, de los cuales el exón 5 codifica la NKB. (Figura 49-B) En humanos existen a su vez, dos isoformas precursoras: la α TAC 3 y la β TAC3 (Page, Morrish et al. 2009). Este gen se expresa principalmente en los tejidos periféricos (Page 2010). En los últimos años numerosos artículos demuestran la especial implicación del gen TAC 3 con el sistema neuroendocrino (Topaloglu 2010), (Topaloglu, Tello et al. 2012) (Hu, He et al. 2014).

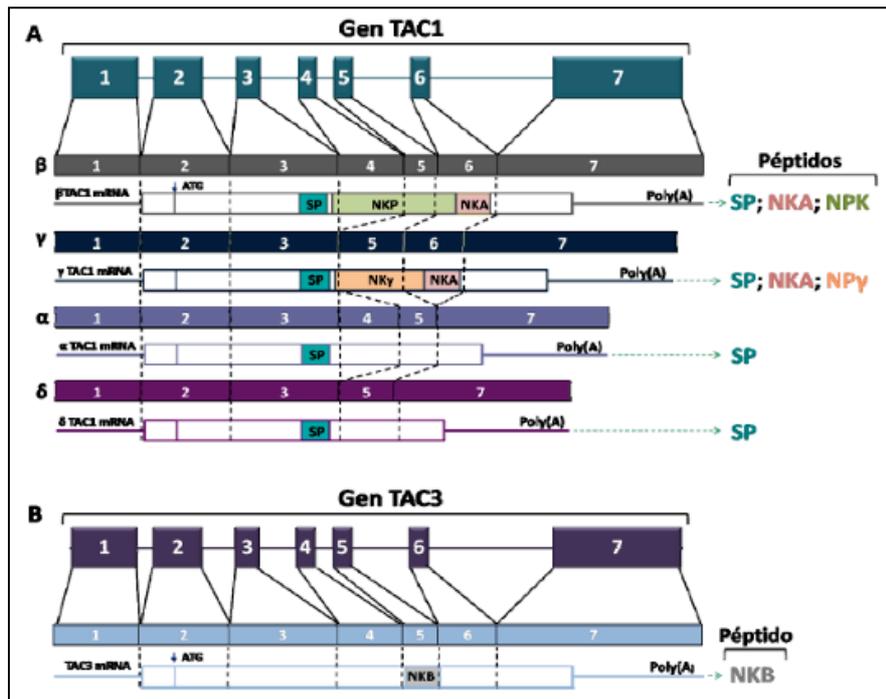


Figura 49: Organización de los exones de TAC1 y TAC3 humano mostrando las posiciones de los diferentes péptidos. A. Gen TAC1, de 7 exones da lugar a cuatro ARN_m diferentes por *splicing* alternativo. β TAC1 codifica para SP, NKA y NPK; γ -TAC1 codifica para SP, NKA y NPY. α TAC1 únicamente codifica para SP al igual que δ TAC1. B. El gen TAC3 también consta de siete exones pero codifica solamente para NKB en humanos. Imagen tomada de (García Recio 2012)

El último gen de las TK de mamíferos descrito ha sido el gen TAC 4, descubierto en el año 2000 (Zhang, Lu et al. 2000). Zhang y sus colaboradores identificaron el nuevo gen en células hematopoyéticas de estirpe linfóide B de la médula ósea de ratón y lo denominaron preprotaquicinina-C, siendo posteriormente renombrado como TAC-4. Dos años más tarde se caracterizó y aisló este gen en humanos (Kurtz, Wang et al. 2002). El gen TAC 4 codifica el péptido hemoquinina-1 (HK-1) que al compartir la secuencia carboxi-terminal característica de las TK fue incluido como miembro de esta familia (Page 2004). Además, produce otros 4 péptidos llamados endocininas (EK_s): EKA, EKB, EKC y EKD (Page 2006). Mediante *splicing* el gen TAC 4 da lugar a 4 isoformas distintas de ARNm: α , β , γ y δ . Se sabe que la EKB está codificada por las cuatro isoformas, la EKA y la EKC únicamente lo están por α TAC4 y la EKD por β TAC4. Las endocininas parecen tener un importante papel en las patologías placentarias, aunque se

expresan ampliamente en diversos tejidos periféricos humanos. (Page, Kemp et al. 2002) (Page, Bell et al. 2003).

Síntesis de las taquicininas

La síntesis de las taquicininas responde al modelo general de formación de péptidos. Así, tras obtener el ARNm, fruto de la transcripción de los genes TAC1 TAC3 y TAC4, se genera un PREPROPÉPTIDO que es un polipéptido constituido por un péptido de señal, una o varias copias del neuropéptido y una o varias regiones espaciadoras. El péptido señal posee hasta 30 aminoácidos, se localiza en el extremo N-terminal y permite que el péptido en formación se acople y atraviese el retículo endoplasmático para inmediatamente después ser escindido, dando lugar al propéptido. El PROPÉPTIDO es transportado al aparato de Golgi, donde se escinden las regiones espaciadoras dando lugar al PÉPTIDO ACTIVO final, que es el que será empaquetado en gránulos secretores y almacenado (Pennefather, Lecci et al. 2004) (Figura 50).

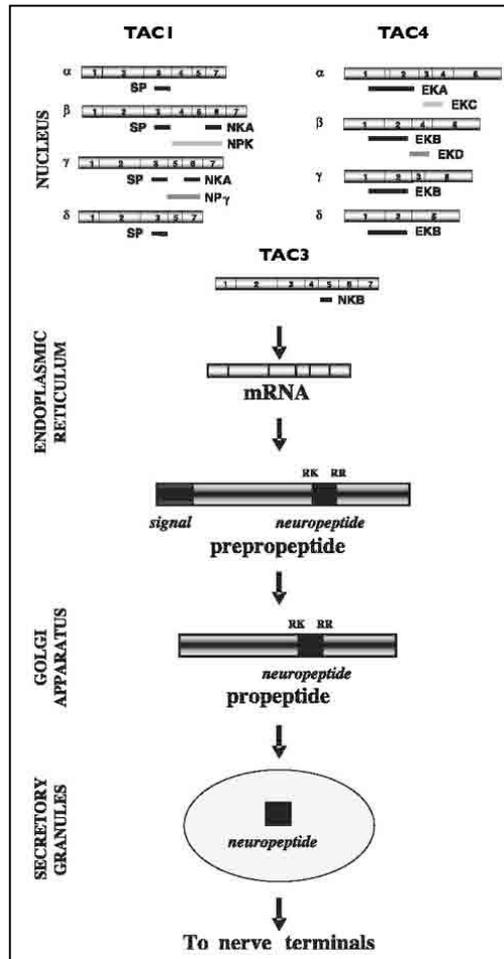


Figura 50: Esquema del proceso general de síntesis neuronal de las taquicinas a partir de los genes TAC1, TAC3 y TAC4. (Imagen modificada de (Pennefather, Lecci et al. 2004))

4.3 RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS: Estructura genética y tipos

Los receptores taquicinérgicos (Tabla 4) que se han descrito hasta la actualidad se han dividido en tres tipos diferentes según sus ligandos de mayor afinidad: receptor de la neurokinina-1 (NK1-R), receptor de la neurokinina-2 (NK2-R) y receptor de la neurokinina-3 (NK3-R), quienes presentan una afinidad preferente, pero no única por la SP, NKA y NKB, respectivamente (Werge 2007). Cada TK presenta una afinidad y potencia de activación diferente para cada tipo de receptor (Tabla 5). Así, por ejemplo, la afinidad de NKA y NKB por el receptor NK-1 es 100 y 500 veces respectivamente menor que la SP (Gerard, Garraway et al. 1991). Respecto a la HK1, EKA y EKB presentan alta afinidad por el NK1-R, con una potencia de activación similar a la SP produciendo efectos similares a nivel

periférico. Por ello nos referimos en ocasiones a la HK-1 y endokininas como SP-like HK. Determinados estudios sugieren que estas SP-like HK representan el ligando endógeno principal del NK1-R en el tejido periférico, especialmente en tejidos no innervados. (Zhang, Lu et al. 2000), (Kurtz, Wang et al. 2002, Page, Bell et al. 2003).

Tipo receptor taquicinérgico	Proteína. Nº aminoácidos	Gen	Orden de afinidad para las taquicininas
NK1-R	407	TACR1	SP* y HK1** > NKA > NKB
NK2-R	398	TACR2	NKA > NKB > SP
NK3-R	465	TACR3	NKB > NKA > SP

Tabla 4: Receptores taquicinérgicos: Comparación de la afinidad de las TK por cada tipo de receptor.

* La SP es el ligando endógeno principal del NK1-R. ** Se sugiere que HK1 sería ligando de NK1-R en tejido periférico no innervado

TAQUICININAS	Afinidad receptor	Secuencia de aminoácidos ^a
Sustancia P	NK1-R	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Hemokinina 1	NK1-R	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neurokinina A	NK2-R	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neurokinina B	NK3-R	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂

Tabla 5: Secuencia de aminoácidos de las TK. Relación entre la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal y la afinidad por un subtipo de receptor taquicinérgico.

En negrita región pentapeptídica carboxi-terminal común a las TK

Subrayado: Aminoácido en posición 4 C-Terminal. El residuo aromático fenilalanina (Phe) determina una selectividad incrementada hacia NK1-R. Los aminoácidos que ocupan la posición 7 del extremo C-terminal (en rojo) si son residuos básicos o neutrales como Gln: Glutamina y Ser: Serina, tienen preferencia por NK1R. Asp: Acido aspártico (aminoácido ácido).

El primer receptor clonado fue el NK1-R en el año 1987 (Masu, Nakayama et al. 1987), pocos años después se lograron clonar el resto de RTK, permitiendo de

esta forma, conocer sus estructuras y reconstruirlos físicamente (Ohkubo and Nakanishi 1991)

El NK1-R es una proteína, similar en todos los mamíferos, compuesta por 407 aminoácidos y una masa molecular relativa de 46kDa (Hopkins, Powell et al. 1992). El NK2-R humano consta de 398 aminoácidos, y éste, al igual que el NK3-R, sí varía en función de la especie. Así, por ejemplo el NK2-R de la rata que tiene 390 aminoácidos. Por último el NK3-R es el mayor de los tres receptores, conteniendo 465, 452 y 440 aminoácidos en humanos, ratas y cobayas respectivamente.

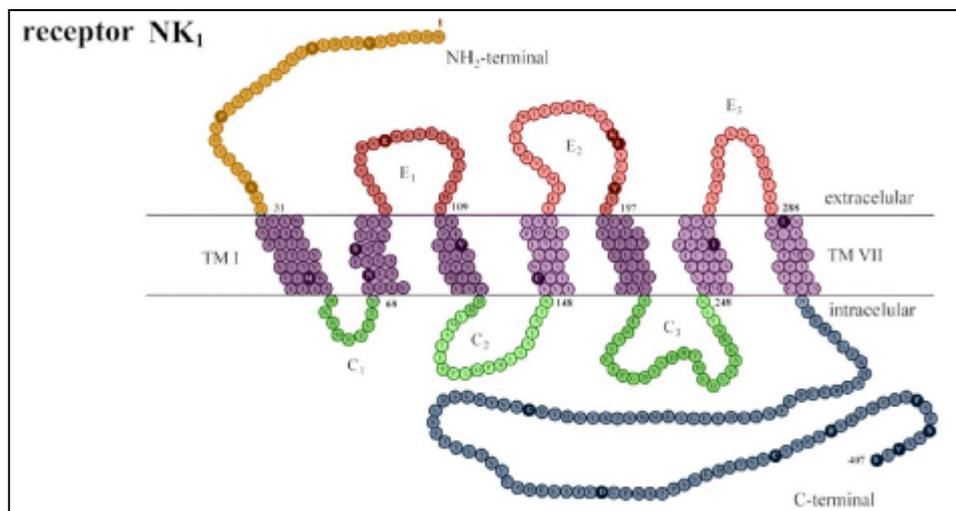
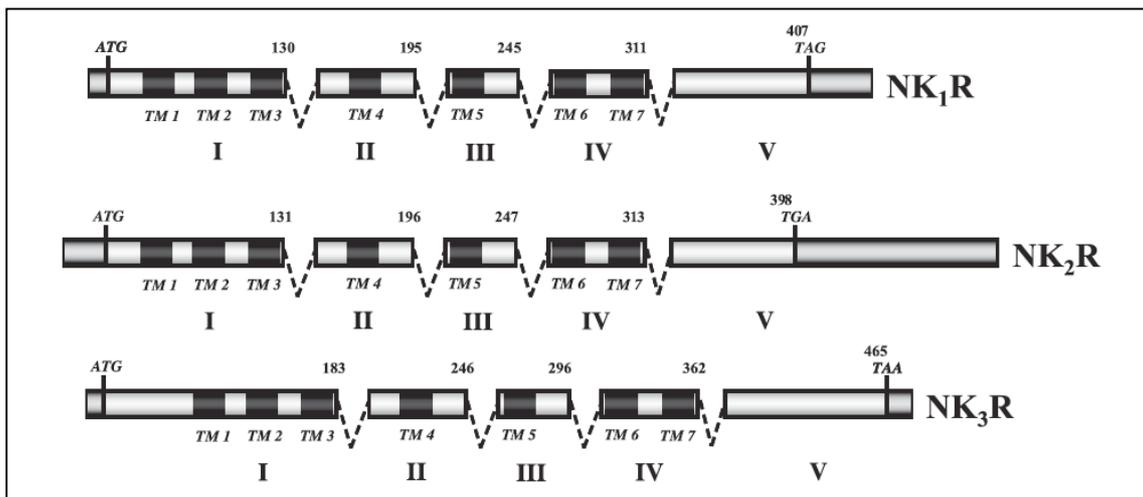


Figura 51: Representación esquemática de la estructura del receptor NK1 humano. Se muestran los tres bucles extracelulares (ECL1,2,3) y los tres bucles intracelulares (ICL 1,2,3). A la izquierda el extremo amino-terminal: lugar de reconocimiento de su ligando e implicado en la afinidad neuropéptido-receptor. A la derecha el extremo carboxi-terminal: sitio esencial para la activación del receptor mediante la unión a proteína G. (Imagen tomada de Almeida et al (Almeida, Rojo et al. 2004).

Los receptores taquicinérgicos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) de tipo 1 o *rodhoopsin-like* y están codificados por 5 exones (Maggi 1995). Son receptores que poseen siete dominios hidrofóbicos transmembrana, que comparten la misma unidad estructural: constan de tres bucles extracelulares (EL1, EL2, EL3) y tres intracelulares con la posibilidad de un cuarto debido a la palmitoilación de una cisteína (C1, C2, C3 +/- C4), siete dominios intermembrana (TM 1-VII), un extremo amino terminal extracelular y otro carboxilo terminal citoplasmático (Pennefather, Lecci et al. 2004) . El dominio

carboxilo terminal de las taquicinas es la zona que interacciona con los receptores mientras que la secuencia amino terminal es la que confiere la especificidad. La desamidación del extremo C-terminal de las TK imposibilita la actividad de las TK (Werge 2007). Además este extremo contiene residuos serina/treonina que cuando son fosforilados causan la desensibilización de receptor una vez que ha sido activado repetidas veces por el agonista. El segundo y tercer bucle están relacionados con la unión de los agonistas o antagonistas, mientras que el tercer lazo citoplasmático es el que se une a la proteína G.

Los tres receptores taquicinérgicos están codificados por tres genes diferentes: gen del receptor de taquicina 1 (TACR1), 2 (TACR2) y 3 (TACR3). Estos tres genes se encuentran en el cromosoma 2 y tienen la misma organización estructural: una región codificante dividida en cinco exones separados entre sí por intrones situados en idénticas posiciones para todos ellos (Pennefather, Lecci et al.



2004).

Figura 52: Representación esquemática de la organización de los genes que codifican los receptores taquicinérgicos humanos. Las regiones codificantes de los genes se dividen en cinco exones (I-V) separados entre sí por cuatro intrones (señalados por líneas discontinuas). Los segmentos transmembrana codificados por cada exón aparecen con color negro e identificados con las letras TM (1-7). También se indican las posiciones de los aminoácidos en los lugares de splicing (Imagen tomada de (Pennefather, Lecci et al. 2004)

4.4 DISTRIBUCIÓN DE LAS TAQUICININAS Y SUS RECEPTORES

Las taquicininas están ampliamente expresadas en distintos sistemas, y aunque inicialmente se pensó que tenían exclusivamente un origen neuronal, hoy se sabe que están presentes en muchos tejidos de diversas especies animales (Takeda, Takeda et al. 1990), (Palma 2006) El descubrimiento de la HK-1 en el año 2000 (Zhang, Lu et al. 2000) acabó definitivamente con aquel clásico concepto que restringía la presencia de las TK al tejido neuronal o que explicaba su acción a nivel periférico por la liberación desde terminaciones nerviosas. Años antes ya se había comprobado la existencia de TK en diversos sistemas periféricos e incluso en la placenta, que es un órgano carente de inervación (Muñoz, Pavón et al. 2010).

Los receptores de las taquicininas, por su parte, tienen una distribución particular, no uniforme. Así, mientras que los receptores NK-1 y NK-3 se encuentran en el sistema nervioso y en los tejidos periféricos, los receptores NK-2 se localizan casi exclusivamente en tejidos periféricos y de forma muy selectiva en algunos núcleos cerebrales (Pennefather, Zeng et al. 1993), (Saffroy, Torrens et al. 2001), (Almeida, Rojo et al. 2004), (Pinto, Almeida et al. 2004).

La expresión de NK1-R, es muy amplia tanto a nivel central como periférico, habiéndose descrito en neuronas, células gliales, endotelio, músculo, sistema inmunológico, cardiovascular, glandular o gastrointestinal entre otros (Longmore, Hill et al. 1997). Participa en respuestas celulares como la transmisión del dolor, la secreción endocrina y paracrina, la vasodilatación y la modulación de la proliferación celular. También tiene un papel importante en la transmisión sensorial neuronal asociada con la depresión, ansiedad o estrés. El papel que juega la SP y el NK1-R en el sistema inmune también es muy importante habiéndose identificado este receptor en linfocitos, monocitos, macrófagos, células NK o microglía (Weinstock, Blum et al. 1988). Tanto NK1-R como NK2-R se han aislado en la médula ósea donde sus correspondientes taquicininas son consideradas como importantes agentes reguladores de la hematopoyesis (Bandari, Qian et al. 2003). Respecto al NK3-R, que tiene una mayor afinidad por la NKB, tiene una amplia distribución en los tejidos periférico siendo en el sistema neeuroendocrino

en el que tiene un papel fundamental. (Topaloglu 2010), (Topaloglu, Tello et al. 2012) (Hu, He et al. 2014).

5. SUSTANCIA P y RECEPTOR NK-1: DISTRIBUCIÓN, FUNCIÓN, FISIOLOGÍA, PATOLOGÍAS Y USOS TERAPÉUTICOS.

5.1 RECEPTOR NK1

El NK1-R o receptor de la neurokinina-1 pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs, del inglés *G protein-coupled receptor*), que como ya se detallaba en el apartado 3.2, son unas proteínas transmembrana con un importante papel en la comunicación intercelular. Aunque los GPCRs comparten una estructura común, existen características diferenciadoras en función del tamaño amino terminal, los bucles citoplasmáticos y el grupo carboxilo terminal. En base a estas diferencias los GPCRs de mamíferos se han clasificado en 3 tipos, A, B y C. Pues bien, el NK1-R pertenece a la familia A (rhodopsin-like o adrenergic receptor-like) que está codificado por 5 exones y se caracteriza por poseer una estructura amino terminal corta y unos residuos ácidos constantes en cada hélice transmembrana.

5.1-1 SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR GPCRs

A) INICIO DE LA SEÑALIZACIÓN DEL NK1R

Tras la unión del agonista a su receptor en la superficie celular, se produce una reordenación de las α -hélices transmembrana que inducen un cambio conformacional en la superficie citoplasmática del receptor que permite la interacción con la proteína G formando un complejo de alta afinidad: SP-NK1R-Proteína G que completa el mecanismo de señal e inicia la vía efectora. La forma activada de la proteína G se disocia del receptor y activa la proteína efectora modulando los niveles de segundos mensajeros intracelulares entre los que figura tanto la **Fosfolipasa C (PLC)** como la **Adenilato ciclasa (AC)** y como consecuencia

de las mismas se produce una movilización del calcio intracelular a través del fosfoinositol (Guard and Watson 1991) (Figura 53).

La principal proteína G responsable de las vías de movilización del calcio es la $G_{\alpha q}$, mientras que la $G_{\alpha s}$ activa la adenilato ciclasa (Palanche, Ilien et al. 2001). La vía de señalización clásica de NK1R implica a la PLC como segundo mensajero sugiriendo que la subunidad $G_{\alpha q}$ es la predominante en la activación de NK1R (Krause, Takeda et al. 1992).

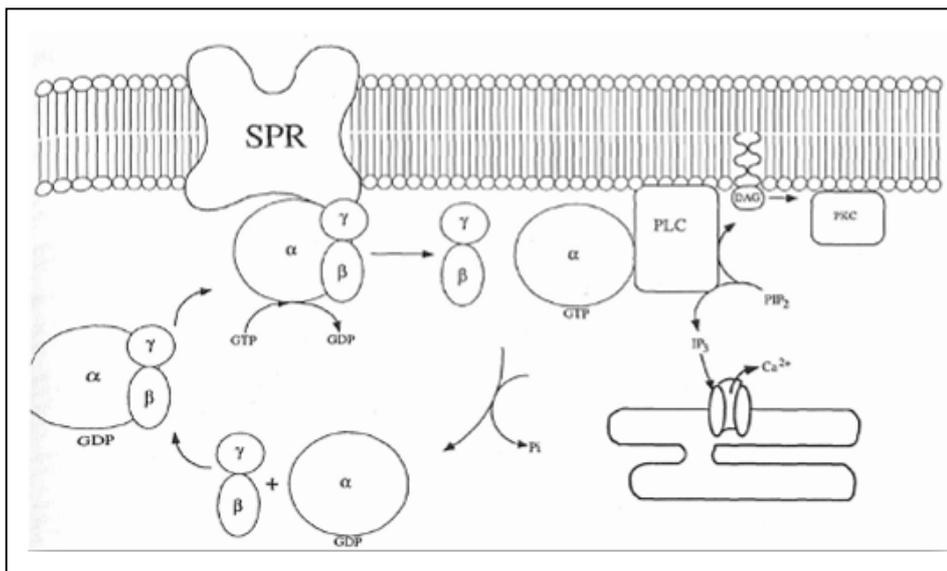


Figura 53: Modelo de activación del receptor de la sustancia P (SPR) o NK1R. Formación del complejo SP-Receptor-Complejo proteína G. La disociación de G_{α} del complejo proteína G tras la unión del ligando y receptor resulta en la activación de la fosfolipasa C (PLC) la cual genera dos segundos mensajeros: el IP_3 que permite la movilización de calcio intracelular y el diacilglicerol el cual activa la PKC (protein-quinasa C). Imagen tomada de (Krause, Takeda et al. 1992)

La SP a través de la forma activada de la proteína G inicia distintas vías de señalización (figuras 54 y 55):

- Activación de la fosfolipasa (PLC) que conduce a la formación de inositol trifosfato (IP_3) que aumenta el calcio intracelular, y de diacilglicerol (DAG) que activa la vía de la protein quinasa C (PKC). Esta es una de las vías de señalización principales del NK1-R.

El aumento del calcio intracelular, conduce a la activación de una proteinquinasa llamada prolina-tirosina quinasa rica 2 (Pyk2, del inglés

protein tyrosine kinase 2), que regula la actividad de la proteinquinasa Src, que inicia la cascada de fosforilación que activa las proteincinasas activadas por mitógenos (MAPK). La PLC también puede activar directamente otra proteinquinasa Raf.

- Activación de la enzima adenilatoclasa (AC) que convierte el adenosín trifosfato (ATP) citoplasmático en adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y estimula la activación de la protein-kinasa A (PKA), que a su vez fosforila el factor de transcripción CREB (del inglés, cAMP-responsive element CRE-binding protein). Así actúa sobre el ADN y produce efectos sobre metabolismo, crecimiento y diferenciación celular.
- Activación de fosfolipasa A₂ (PLA₂) y producción de ácido araquidónico (AA) que es precursor de mediadores inflamatorios lipídicos (prostaglandinas (PG_s), leucotrienos (LX), y tromboxano A₂ (TXA₂)).
- La SP activa el principal factor de transcripción nuclear proinflamatorio o Factor de activación nuclear kappa B (NF kB) en las células generando IL6 e IL8 y TNF α (Factor de necrosis tumoral α) con acción pro-inflamatoria
- Activación de la proteinquinasa asociada a Rho (ROCK_s) que regulan la cadena ligera reguladora de la miosina (MLC). La fosforilación de esta proteína está relacionada con la apoptosis y también con la desestructuración citoplasmática en el caso de la migración celular.
- La SP y el NK1-R transactivan el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por un mecanismo dependiente de proteína G que activa metaloproteinasas (ADAM) que escinden y liberan agonistas de EGFR. LA activación de EGFR dimeriza, fosforila y ensambla un complejo SHC/Grb2 que induce la activación de MAPK (protein-kinasa activadas por mitógenos) y las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) y por tanto, la síntesis de ADN y la proliferación (Yamaguchi, Kugimiya et al. 2005, Yamaguchi, Richardson et al. 2005). Las MAPK incluyendo las kinasas ERK1/2 fosforilan distintas proteínas y regulan distintas funciones celulares incluyendo proliferación, expresión de genes, diferenciación y supervivencia celular, o lo que es lo mismo, esta vía es la que media la

actividad proliferativa y anti-apoptótica de la SP a través del NK1-R (Martin, Charles et al. 1992), (Kavelaars, Jeurissen et al. 1994), (Luo, Sharif et al. 1996)

- La activación de las vías de señalización conducen a efectos específicos que incluyen inflamación, proliferación, anti-apoptosis, excitación neuronal y migración celular.

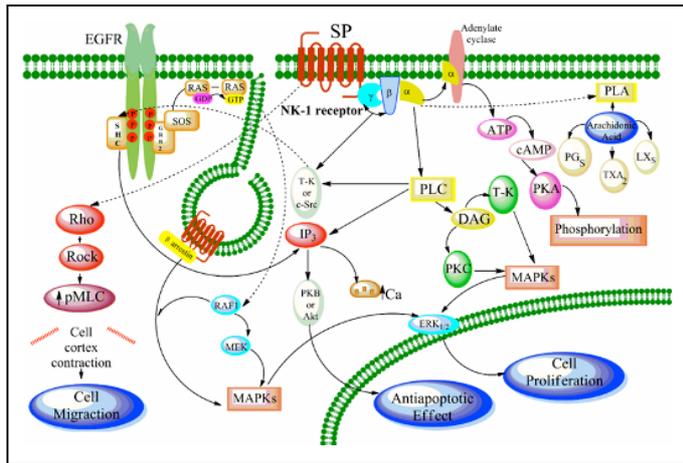


Figura 54. Representación esquemática de las vías de señalización intracelular tras la activación del NK1-R por la SP (ATP: adenosín trifosfato; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; DAG: diacilglicerol; IP3: inositol trifosfato; MAPKs: protein-quinasa activadas por mitógenos; PKA: protein quinasa A; PKB: protein quinasa B; PKC: protein quinasa C; PLA: fosfolipasa A; PLC: fosfolipasa C; pMLC: fosforilación de la cadena ligera de la miosina; T-K: tirosina quinasa; (Imagen tomada de (Rosso, Muñoz et al. 2012).

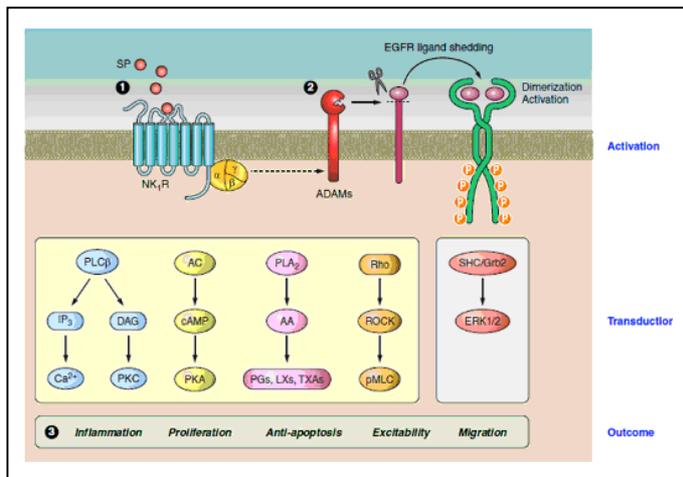


Figura 55: Mecanismos de activación del NK1-R (ver texto). Imagen tomada de (Steinhoff, von Mentzer et al. 2014)

La activación de las MAPK no solo depende de las proteínas G y de su vía de señalización clásica, sino a través del complejo de andamaje multiproteico formado para la internalización del NK1-R y el reclutamiento de sus proteínas por parte de las β -arrestinas. La SP induce el ensamblamiento de un complejo endosómico de señalización (señalosoma) que comprende el NK1-R, la arrestina, la tirosinquinasa Src y MEKK y ERK1/2. Este complejo promueve la translocación nuclear de ERK1/2 activado que es necesario para el efecto proliferativo y antiapoptótico de SP (DeFea, Vaughn et al. 2000, DeFea, Zalevsky et al. 2000) (Figura 56)

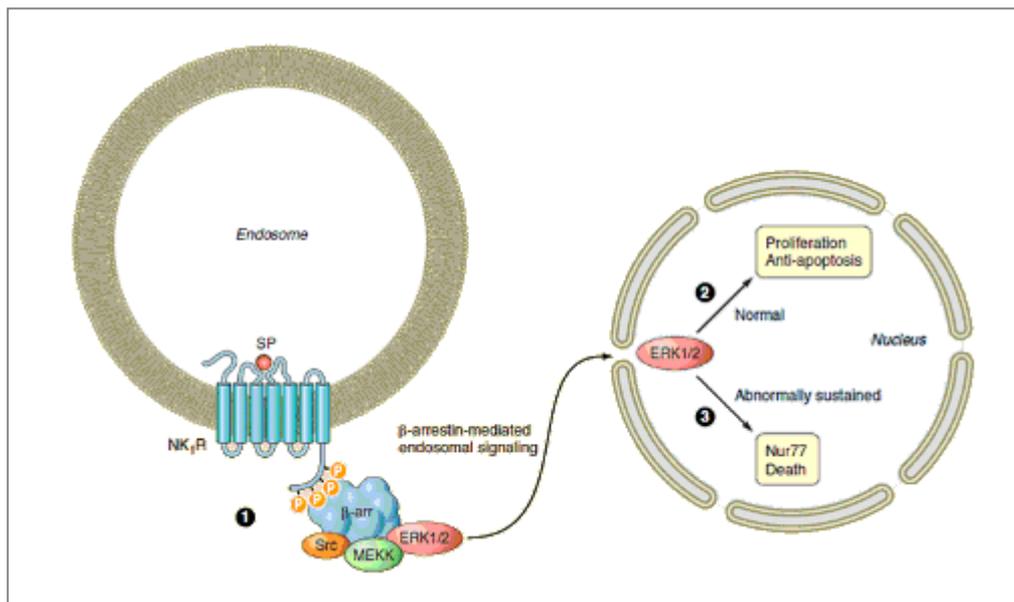


Figura 56. Esquema del efecto proliferativo y anti-apoptótico de la SP a través de β -arrestina en la membrana endosomal. Imagen tomada de Steinhoff MS et al. 2014, pag 272: 1) β -arrestina (β -arr) recluta el complejo NK1R, β -arrestina, Src, MEKK y ERK o signalosoma para mediar la fosforilación y activación de la vía ERK o MAPK y trasladarse al núcleo. 2) En circunstancias normales la vía ERK/MAPK media el efecto antiapoptótico y proliferativo de la SP. 3) Cuando la activación de la vía ERK/MAPK está anormalmente mantenida, como ocurre con las células a las que les falta la forma activa de ECE-1 (Enzima convertidora endotelial) se produce muerte celular a través de la inducción de Nur77.

B) FINALIZACIÓN DE LA SEÑAL NK1R

En 1995 Mantyh y colaboradores demostraron que tras una estimulación somatosensorial, NK1-R sufría una dramática internalización reversible (Figura 57). (Mantyh, DeMaster et al. 1995)

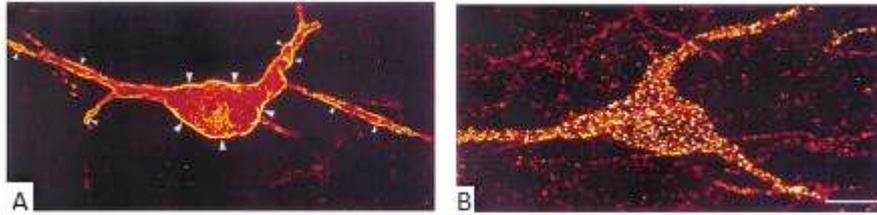


Figura 57. Internalización del NK1-R tras un estímulo somatosensorial. (A) Receptor en la membrana celular (flechas). (B) Receptor internalizado ocupando el citoplasma de las neuronas tras estímulo doloroso. Imagen tomada de (Mantyh, DeMaster et al. 1995)

Grady y colaboradores determinaron que la SP y su receptor se internalizan rápidamente por la acción de la clatrina. En ausencia de SP, el NK1-R se localiza en la membrana plasmática, pero cuando la célula está expuesta a este NP, el complejo ligando-receptor se internaliza. A diferencia de NK1-R, la SP se degrada enzimáticamente en el interior de los endosomas, pues no aparece de nuevo en la membrana. Estos mecanismos de endocitosis y reciclaje de los receptores serían responsables de los fenómenos de desensibilización y resensibilización del NK1-R en presencia de SP por medio de los cuales la célula conseguiría hacerse insensible en situaciones con cantidades excesivas de SP como en los procesos inflamatorios (Grady, Garland et al. 1995).

La finalización de la señal ocurre por mecanismos que retiran el ligando del fluido extracelular (recaptación y degradación de la SP) y por mecanismos que restringen la capacidad del receptor de unirse a su maquinaria de activación a través de la proteína G (desacoplamiento y desensibilización del receptor) (Figura 58).

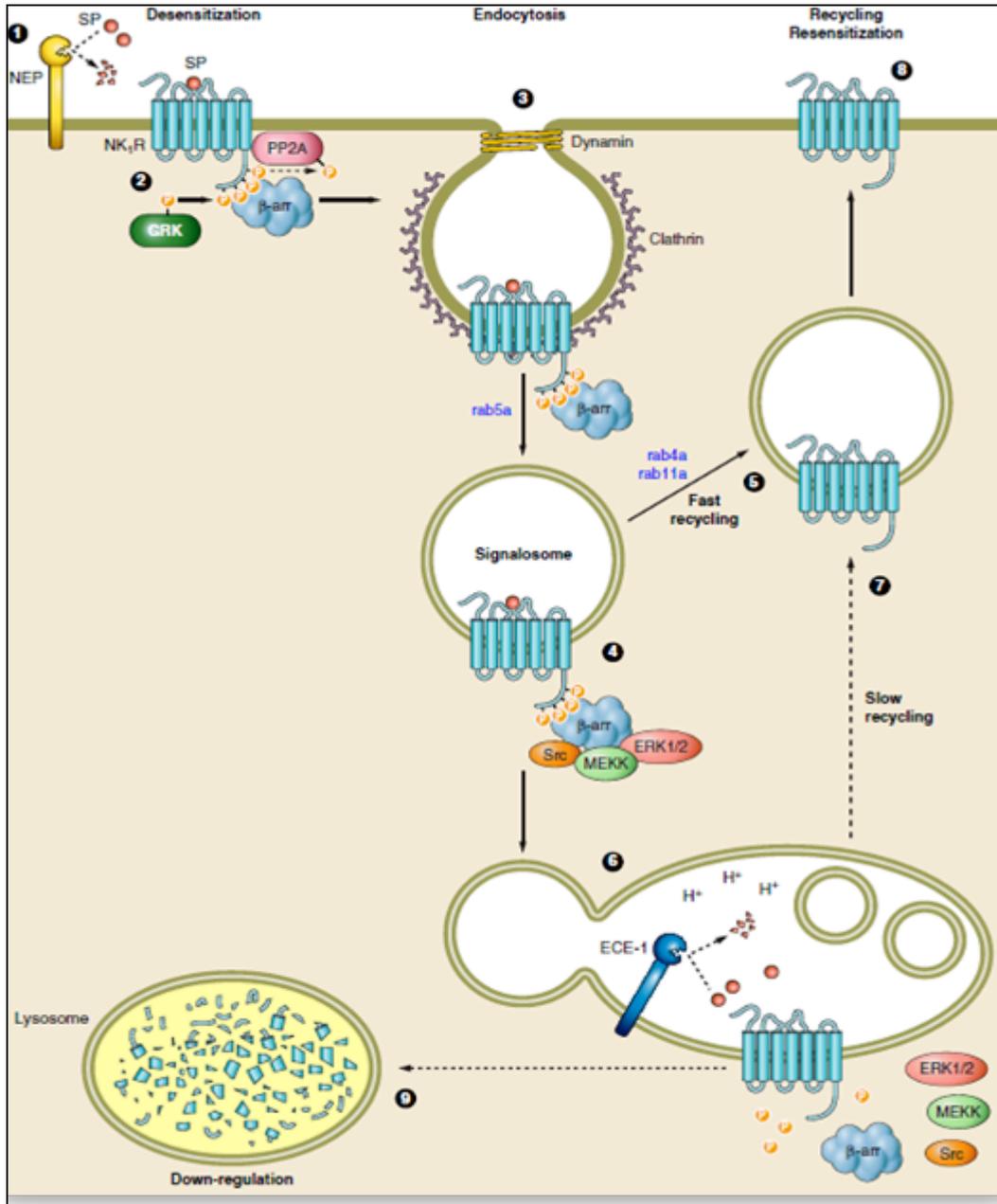


Figura 58. Ruta endocelular. Mecanismos de desensibilización y resensibilización del NK1-R. 1: NEP: Endopeptidasa neutra degrada la SP en el medio extracelular. 2: Fosforilación en el loop 3 intracelular del NK1R en su extremo C-terminal. Esta fosforilación incrementa la afinidad de NK1-R por β -arrestina mediante la desensibilización del receptor. La β -arrestina también recluta la proteína fosfato 2A (PP2A) que puede defosforilar NK1-R y devolverlo a la membrana celular. 3: β -arrestina a través de clatrina promueve la endocitosis de SP-NK1-R. 4: Formación del signalosoma endosomal para activar las vías de señalización. Rab5a media este tráfico del endosoma temprano. 5: NK1-R puede sufrir un mecanismo de reciclaje rápido dependiente de rab4a y rab11a. 6: De forma alternativa, el NK1-R circula en el endosoma hacia una localización perinuclear que contiene ECE-1 y degrada SP. 7: Vía de reciclaje lenta de NK1-R para finalizar en superficie resensibilizado (8). 9: Tras un estímulo prolongado de altas concentraciones de SP, el NK1-R es conducido a los lisosomas para su degradación y regulación a la baja de la señalización de SP. Imagen tomada de (Steinhoff, von Mentzer et al. 2014).

En resumen, la finalización de la señal ocurre de la siguiente manera:

- Degradación de la SP en el fluido extracelular a través de una metaloproteasa de la membrana celular llamada endopeptidasa neutra.
- La fosforilación del NK1-R en su extremo C-terminal por las kinasas de RAPG provoca la unión y reclutamiento de la proteína citosólica β -arrestina la cual bloquea la capacidad del receptor de interactuar con otras proteínas G, conduciendo a una rápida desensibilización (Bünemann and Hosey 1999), (Jorgensen, Holliday et al. 2008). Como resultado de esta unión de β -arrestina, el receptor fosforilado es objeto de endocitosis mediado por clatrina, un proceso que finalmente re-sensibiliza y recicla los receptores a la membrana plasmática (Reiter and Lefkowitz 2006).
- La metaloproteasa de membrana ECE-1 (enzima convertidora de endotelina 1) degrada la SP en los endosomas y desancla los componentes del complejo signalosoma atenuando la señal ERK/MAPK (Cottrell, Padilla et al. 2009). Este hecho es importante, pues la inhibición de la enzima ECE-1 produce una actividad mantenida de la vía ERK a través de la SP que lleva a la activación del receptor Nur77 de muerte celular y a neurotoxicidad.
- Finalmente para el proceso completo de resensibilización, se requiere la disociación de β -arrestina y el reciclaje de NK1R en la membrana celular.

5.1-2 Isoformas, glicosilación y clasificación del NK1-R

El NK1-R tiene 407 aminoácidos y una masa molecular relativa de 46 kDa (Hopkins, Powell et al. 1992). Existe una isoforma más corta, el **NK1-Truncado (NK1-Tr)**, fruto del *splicing* en NK1-R que pierde los últimos 96 aminoácidos en el extremo C-terminal, y tiene por tanto, 311 aminoácidos (Fong, Anderson et al. 1992), (Caberlotto, Hurd et al. 2003) (Figura 54). El NK1-Tr se genera cuando el intrón que se encuentra entre el exón 4 y 5 no es eliminado y un codón stop prematuro se identifica antes de empezar el exón 5. Al perder este extremo, el NK1-Tr se desprende de una zona del receptor que es clave para el proceso de

internalización del mismo, una vez unido su ligando. Este es el motivo, entre otros, que explicaría los defectos de internalización del NK1-Tr así como las distintas vías de señalización intracelular que sigue esta isoforma o la resistencia a la desensibilización homóloga en comparación con la isoforma larga (Déry, Defea et al. 2001). Algunos estudios han puesto de manifiesto estas diferencias. Por ejemplo, Lai y Douglas observaron como un grupo de células que expresaban la forma larga del receptor activaban NF- κ B e IL-8 mientras que las que expresaban la forma trunca presentaban una menor expresión de ARNm de IL-8 y no podían activar a la proteína NF- κ B. En la misma línea, la activación de la proteína quinasa Erk también se veía alterada en el mismo grupo de células: mientras que la fosforilación de esta proteína a través de la isoforma larga se producía en 1 o 2 minutos, las células transfectadas con la isoforma trunca no podían activar Erk hasta los 20 minutos después de la exposición a SP (Lai, Lai et al. 2008). El resumen de las características de la forma trunca NK1-R serían las siguientes (Tabla 11):

- Tiene una afinidad por la SP menor que por la forma completa (Fong, Anderson et al. 1992)
- Presenta limitaciones en los mecanismos de internalización o endocitosis del receptor (Böhm, Khitin et al. 1997).
- Más resistente a la desensibilización del receptor en comparación con la forma full-length (Li, Douglas et al. 2000) con una mayor capacidad de mantener una respuesta prolongada tras ser activado.
- No sigue las mismas vías de señalización (Déry, Defea et al. 2001) que full-length NK1-R.
- La acción proliferativa y anti-apoptótica a través de la vía ERK-MAPK es independiente de proteína G y es más lenta.

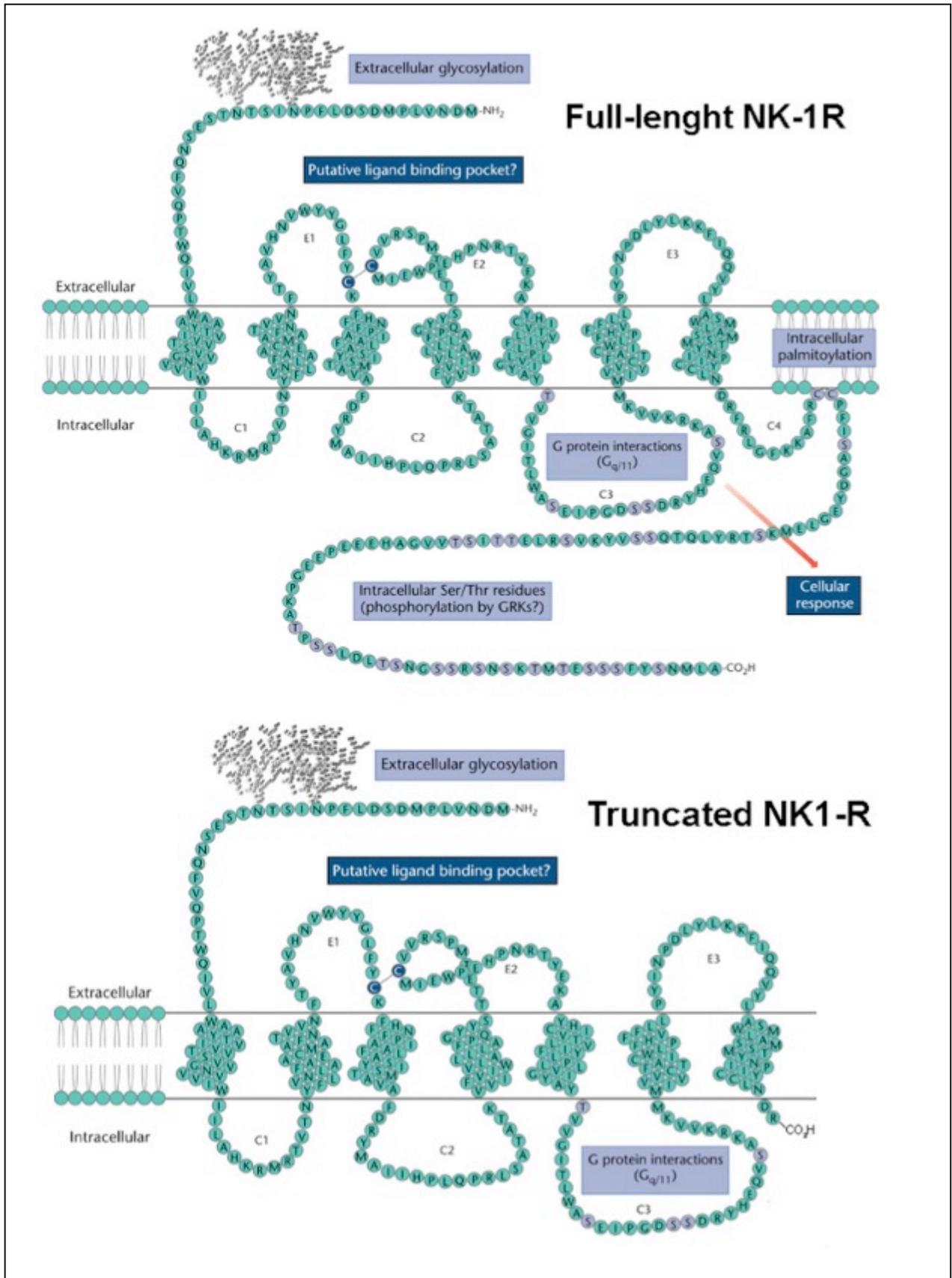


Figura 59. Esquema modelo del NK1-R. Arriba isoforma completa de 407 aminoácidos o isoforma larga (NK1-FL). Contiene un extremo N-terminal extracelular, siete dominios que atraviesan la

membrana, 3 bucles extracelulares (E1, E2 y E3) y 3 bucles intracelulares (C1, C2, C3), un posible C4 debido a palmitoilación de un residuo Cys y un extremo C-terminal intracelular. Asn14 y Asn18 se indican como sitios putativos de glicosilación. Abajo isoforma truncada con 311 aminoácidos y donde se observa que ha perdido parte del extremo C-terminal intracelular así como los residuos Ser/Thr intracelulares responsables de la internalización. Modificado de (García Recio 2012)

EFECTO	NK1R full-length	NK1R truncado
Longitud de NK1-R	407 aminoácidos	311 aminoácidos
Movilización calcio intracelular	Sí	No
Activación ERK	Rápida (<1min) y mantenida	Lenta (pico a los 20-30 min)
PKCδ fosforilación	Aumentado	Disminuido
Activación NF-kB	Sí	No
Expresión mRNA IL-8	Aumentado	Disminuido

Tabla 6. NK1-R y NK1-R truncado: características diferenciales. Las diferencias en la longitud del extremo C-terminal median las propiedades funcionales del NK1-R truncado Tabla modificada de (Lai, Lai et al. 2008)

Todas estas diferencias pueden tener implicaciones en condiciones patológicas donde se ha observado una regulación positiva del receptor truncado aunque la actividad biológica de NK1-R truncado sigue siendo controvertida.

Existe otro fenómeno que interviene en la señalización y, por tanto, diferenciación del NK1-R: **las glicosilaciones del receptor**. Así, en 2007 el equipo de Leeman demostró que el extremo amino terminal tenía dos sitios Asn (N-) glicosilados y ellos mismos describieron como podían influir estas glicosilaciones en la función del receptor (Tansky, Pothoulakis et al. 2007). Pues bien, los receptores no glicosilados tenían mucha menor afinidad por la SP que los glicosilados. Y de la misma manera que existían diferencias entre la forma completa o truncada del receptor, el NK1-R glicosilado se internalizaba más

lentamente que el NK1-R no glicosilado sugiriéndose que la glicosilación era una característica que estabilizaba al receptor en la membrana. Este fenómeno de la glicosilación explicaría las diversas bandas de pesos moleculares distintos que han sido identificados en los últimos años. Por ejemplo, en linfocitos se han descrito formas del receptor glicosiladas de 58 kDa y en linfoblastos se han observado otras de 38 y 33 kDa (Organist, Harvey et al. 1988). En diversas líneas celulares tumorales humanas: neuroblastoma (Muñoz, Rosso et al. 2005) , glioma (Muñoz, Rosso et al. 2005), retinoblastoma (Muñoz, Rosso et al. 2007), adenocarcinoma de colon (Rosso, Robles-Frías et al. 2008), cáncer de laringe (Muñoz, Rosso et al. 2008) o melanoma (Muñoz, Bernabeu-Wittel et al. 2011).

Por último, muchos estudios describen que algunas formas del receptor tienen afinidades distintas a las propuestas como "clásicas" y por eso dividen al NK1-R en tres clases diferentes (Figura 55):

1. NK1-R "clásico": Es el que tiene una mayor afinidad por la SP
2. NK1-R "sensitivo a septide": Este receptor muestra una afinidad parecida tanto a la SP como a otras taquicininas como la NKA, NPK, NP γ , la NKB y a otros fragmentos sintéticos como es, por ejemplo el fragmento septide 6-11 de la SP que la nombre al receptor (Beaujouan, Saffroy et al. 1999), (Page 2005)
3. New NK1-R "sensitive": Presenta alta afinidad por las taquicininas de mayor longitud y no se puede unir al fragmento septide 6-11(Beaujouan, Saffroy et al. 2000)

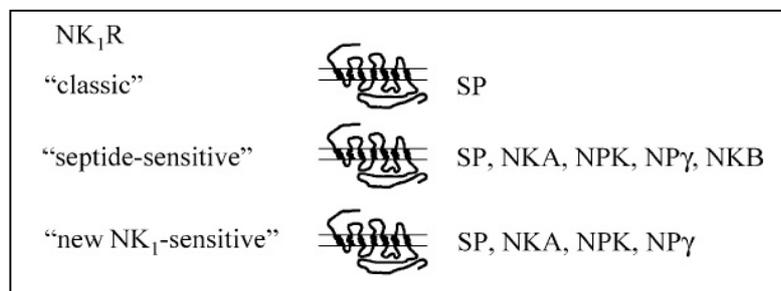


Figura 60: Representación de los subtipos de receptores NK1 con las taquicininas endógenas por las que muestran mayor afinidad. (Imagen modificada de (Page 2005)

A pesar de todo lo expuesto, se necesitan más estudios para conocer con más profundidad los tipos, afinidad y funciones de las isoformas y formas glicosiladas del receptor.

5.1-3 Agonistas y ANTAGONISTAS DEL NK1R

Durante las dos últimas décadas, el descubrimiento de moléculas con actividad antagonista frente al NK1R ha permitido conocer mejor las acciones fisiológicas de la SP y desarrollar nuevos compuestos con una prometedora actividad terapéutica (Muñoz et al 2011).

Antagonistas peptídicos:

Fueron los primeros antagonistas del NK1R descritos. El primer compuesto, el **[DPro2,DTrp7,9]SP**, fue descubierto por Leander a principio de la década de los 80 (Leander, Håkanson et al. 1981), pero entre sus características destacaba su alta neurotoxicidad. Posteriormente, se creó el Spantide I (Folkers, Håkanson et al. 1984) y así sucesivamente fueron apareciendo diversos elementos que buscaban disminuir la neurotoxicidad y aumentar la potencia de acción. La tabla 6 muestra un listado con los principales péptidos con actividad antagonista frente al NK1R.

La mayoría de los trabajos realizados en el diseño de los antagonistas peptídicos se basaban en la introducción de D-aminoácidos que son las formas dextrógiras o especulares de los L-aminoácidos. En general, los antagonistas peptídicos presentan las siguientes desventajas, que constituyen las principales limitaciones para realizar estudios *in vivo*:

- Afinidad por el NK1R mucho menor que sus agonistas naturales.
- Inestabilidad metabólica y rápida inactivación por peptidasas.
- Imposibilidad para atravesar la barrera hematoencefálica
- Neurotoxicidad si se administran en el SNC.

ANTAGONISTAS NK1R	Secuencia de aminoácidos
Sustancia P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
[DPro ² ,DTrp ^{7,9}]SP	Arg-DPro-Lys-Pro-Gln-Gln-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Met-NH ₂
Spantide I	DArg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Met-NH ₂
Spantide II	DLys*-Pro-Pal-Pro-DPhe*-Asn-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Met-NH ₂
[DPro ⁹ ,*Pro ¹⁰ ,Trp ¹¹]SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Dpro-Pro*-Trp-NH ₂
[Orn ⁶ ,AspOBz ¹¹]SP(6-11)	Orn-Phe-Phe-Gly-Leu-AspOBz
Sendide	Try-DPhe-Phe-Dhis-Leu-Met-NH ₂
[DTrp ⁷]Sendide	Try-DTrp-Phe-Dhis-Leu-Met-NH ₂
[Gln ⁶]Sendide	Gln-DPhe-Phe-Dhis-Leu-Met-NH ₂

Tabla 7: Estructura y nombre de los principales antagonistas peptídicos del receptor NK1. Modificada de (Almeida, Rojo et al. 2004)

Antagonistas no peptídicos:

Las limitaciones de los antagonistas peptídicos propiciaron la investigación y búsqueda de moléculas no peptídicas que tuvieran capacidad de unión a los receptores de las taquicininas. Así, el primer antagonista no peptídico descrito con actividad selectiva frente al NK1R fue el **CP-96,345** (Snider, Constantine et al. 1991). Gracias a él, pudo ser analizado el sitio de unión del antagonista competitivo no peptídico. Se observó que, mientras la SP se une a los giros extracelulares de las hélices transmembrana del receptor por su carácter hidrofílico, los antagonistas no peptídicos hidrófobos se unen más profundamente a los segmentos transmembrana (Gether, Johansen et al. 1993) (Figura 56). Los antagonistas no peptídicos de NK1R son pequeñas moléculas lipofílicas capaces de actuar en el sistema nervioso central, ya que, son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica.

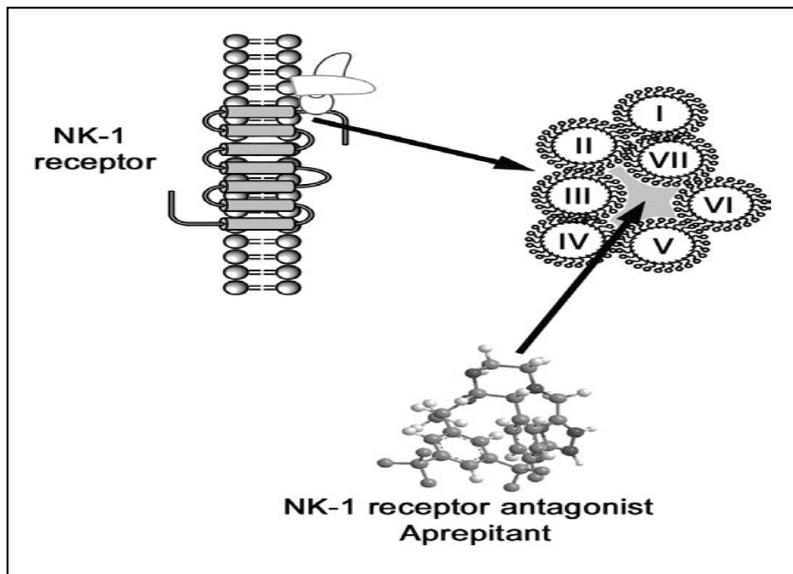


Figura 61. La SP y el Aprepitant (antagonista del RNK-1) Tienen distintos sitios de unión al RNK-1. El antagonista se une a los segmentos profundos transmenbranas de RNK-1 y la SP a las hélices extracelulares del RNK-1. (Imagen tomada de (Muñoz and Coveñas 2011))

Posteriormente, sobre la estructura del primer antagonista no peptídico se elaboraron otros, como el **CP-99,994** (Piedimonte, Bertrand et al. 1993) o el ezlopitant (**CJ-11,974**) (Reed-Hagen, Tsuchiya et al. 1999) con actividad antiemética postquimioterapia. Y así, durante estas dos últimas décadas se ha incrementado el número de artículos que describen nuevos antagonistas existiendo en la actualidad más de treinta compuestos diferentes.

La estructura química de cada antagonista no peptídico es diferente existiendo compuestos de muy diversa naturaleza: esteroidea, amonios cuaternarios derivados de la quinuclidina, derivados del triptófano, análogos de la piperazina o compuestos piperidínicos. Sin embargo comparten la estructura tridimensional o estereoquímica. Todos se unen al NK1R y se sabe que hay poca superposición entre los sitios de unión de la SP y los antagonistas del NK1R.

Desde el punto de vista terapéutico, realmente todos los antagonistas de los NK1R tienen la misma acción diferenciándose unos de otros en la afinidad que presenten por el receptor y en la concentración del antagonista, ya que la acción es dosis dependiente. Se ha descrito que los antagonistas del NK1R producen analgesia, efectos antidepresivos (Kramer, Cutler et al. 1998), (Kramer, Winokur et

al. 2004), ansiolíticos (Quartara and Maggi 1998), antieméticos y antitumorales (Lang, Drell et al. 2004), (Muñoz, Rosso et al. 2005) entre otros. Los compuestos que actualmente hay que resaltar por el papel clínico que desempeñan son: CP-96,345, CP-99,994, RP-67,580, L-733,060, SR-1400333, GR-203040, MEN-11,467, MEN-11,149, Vofopitant (GR-205,171), CP-122,721, Ezlopitant (CJ-11,974), CJ-12,458 y CJ-12,764 (metabolitos activos de Ezlopitant), MK-869 (L-754,030, Aprepitant®), L-758,298, L-742,694 y L-759,274. Entre ellos, los más destacados son:

- **L-733 060:** Desarrollado a partir de CP-99, 994, pertenece a la familia de las benzileter piperidina y muestra una alta afinidad por RNK-1 in vitro en humanos (Munoz, Rosso et al. 2011). Este antagonista produce analgesia (Parenti, Aricò et al. 2012), efectos antidepresivos (Kramer, Cutler et al. 1998), posee efectos antitumorales (Muñoz, Rosso et al. 2005), (Rosso, Robles-Frías et al. 2008) y protector de la inflamación hepática (Bang, Sass et al. 2003)
- **L-732, 138,** antagonista derivado del triptófano es 1.000 veces más potente para RNK-1 que para RNK-2 y RNK-3 en humanos y 200 veces más potentes en RNK-1 humanos que en ratas (MacLeod, Cascieri et al. 1995). Este compuesto, además de antagonizar la permeabilidad vascular de la piel y producir analgesia (Cahill and Coderre 2002), ejerce una acción antitumoral contra varias líneas celulares tumorales humanas (Muñoz, Rosso et al. 2007), (Muñoz, Rosso et al. 2008)
- **MK-869 (Aprepitant)** muestra una alta afinidad por el RNK-1 y es aproximadamente 3000 veces más selectivos para el RNK-1 que para el RNK-3 y es 45.000 veces más selectivo para el RNK-1 que para el RNK-2. El MK-869 es utilizado para el tratamiento del dolor (Chizh, Göhring et al. 2007), la migraña, el prurito (Santini, Vincenzi et al. 2012), la emesis (Lorenzen, Spörl et al. 2014) y diversos trastornos psiquiátricos (Kwako, George et al. 2014). Se ha demostrado además, que el Aprepitant es un fármaco antitumoral de amplio espectro (Muñoz and Coveñas 2011). En la actualidad está aprobada la indicación de aprepitant oral para las náuseas y los vómitos inducidos por quimioterapia. Una proforma de

este fármaco, fosaprepitant, está también aprobada para su empleo intravenoso (Navari 2007)

NK-1 receptor antagonist	Clinical status	Indication
Aprepitant	Clinical use	- Chemotherapy-induced nausea and vomiting - Postoperative nausea and vomiting
Aprepitant	Clinical assay	- Anxiomour - Social anxiety disorder - Anti-HIV
Dapitant	Clinical assay	- Migraine
Fosaprepitant	Clinical use	- Chemotherapy-induced nausea and vomiting - Postoperative nausea and vomiting
Lenapitant	Clinical assay	- Migraine - Osteoarthritis pain
LY-68,6017	Clinical assay	- Alcohol craving - Social anxiety disorder
Nolpitartium	Clinical assay	- Ulcerative colitis
Ovapitant		- Major depressive disorder - Postoperative nausea and vomiting
SSR-240,600	Clinical assay	- Overactive bladder/Urga incontinence urinary
Vestipitant	Clinical assay	- Primary insomnia - Social anxiety disorder - Tinnitus and hearing loss

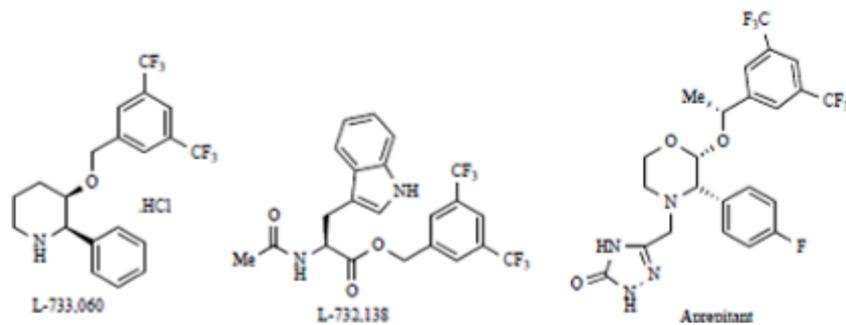


Tabla 8: Indicaciones y usos clínicos de algunos antagonistas de NK1R

Figura 62: Estructura química de los antagonistas no peptídicos del receptor NK1

(Tomado de Muñoz et al 2011)

5.2 SUSTANCIA P

La SP, tal y como desarrollamos al inicio de este apartado, fue descrita por vez primera en el año 1931, cuando, dos jóvenes investigadores trataban de encontrar acetilcolina en extractos hipotalámicos e intestinales de caballo (Von Euler 1931). Desde entonces se ha convertido en la taquicinina más estudiada y mejor caracterizada en cuanto a su distribución e implicaciones fisiopatológicas.

Su aislamiento y la identificación de su secuencia aminoácidica no fue posible hasta comienzos de la década de los 70, cuando Chang y Leeman lo

lograron a partir de hipotálamo de cerebro bovino (Chang and Leeman 1970, Chang, Leeman et al. 1971). Como se ha explicado con anterioridad, la SP es un péptido de cadena corta de once aminoácidos perteneciente a la familia de las taquicininas, codificado por el gen TAC1 (Figura 63). La transcripción del gen produce la pre-protaquicininina-A (PPTA), que puede dar lugar a una de las cuatro isoformas de PPTA, codificando las isoformas α y δ un prepropéptido que contiene SP y las isoformas β y γ unos prepropéptidos que contienen NKA y NPK, y NKA y NP γ , respectivamente (Pennefather, Lecci et al. 2004).

Tras ser liberada a nivel del terminal presináptico, se inactiva fundamentalmente por peptidasas, no participando en su inactivación la recaptación de este neuropéptido. Las enzimas que se encargan de su inactivación son fundamentalmente la endopeptidasa neutral (NE, del inglés *neutral endopeptidase*: EC3.4.24.11) y la enzima convertidora de angiotensina (ACE, del inglés *angiotensin convertin enzyme* EC.3.4.15.1) y también la enzima degradante de la SP (SPDE del inglés *substance-P degrading enzyme*: EC.3.4.21), la dipeptidil aminopeptidasa IV (DP-IV: EC.3.4.14.5), la endopeptidasa post-prolina (PEP: EC3.4.21.26), la catepsina-D (EC.3.3.23) y la catepsina-E (EC.3.4.23.34) (De Swert and Joos 2006).

Secuencia de aminoácidos											
Sustancia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
P	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Gly	Leu	Met	NH ₂

Figura 63. Secuencia de aminoácidos de SP (undecapéptido).

Esta molécula es soluble en agua y alcohol e insoluble en éter y cloroformo. Resiste la ebullición a pH entre 1 y 7 pero se destruye en medio alcalino. Su punto isoeléctrico es cercano a 9 y durante la electroforesis en papel se desvía hacia el cátodo a pH<10. Su actividad biológica es inactivada por la tripsina y pepsina, en cambio resiste la acción de las carboxipeptidasas.

Entre las funciones de la SP destaca su papel como neurotransmisor, neuromodulador y hormonal. Así, fue la primera molécula neuroactiva propuesta como neurotransmisor (LEMBECK 1953) ya que reunía las características

necesarias para ser catalogada como tal: localización neuronal, transporte desde el cuerpo a través del axón, concentración en los terminales nerviosos y liberación dependiente de calcio. No existe recaptación del neuropéptido una vez liberado sino que se inactiva a través de la degradación por peptidasas. A su papel como neuromodulador, la SP tiene la capacidad de liberarse y modificar la acción de un neurotransmisor, modificando su acción o influyendo sobre la cantidad de NT liberado (Burnstock 1985). Por último, la SP también actúa como neurohormona ejerciendo su acción sobre poblaciones celulares situadas a distancia tras ser liberados directamente a la sangre o al líquido extracelular (Strand 1999).

Las acciones biológicas de la SP están mediadas fundamentalmente por el NK1R, siendo la SP el ligando natural con mayor afinidad por este receptor. Es el extremo carboxi-terminal el que interacciona y activa al receptor taquicinérgico, mientras que el amino-terminal define la especificidad frente al subtipo de receptor. (Figura 64)

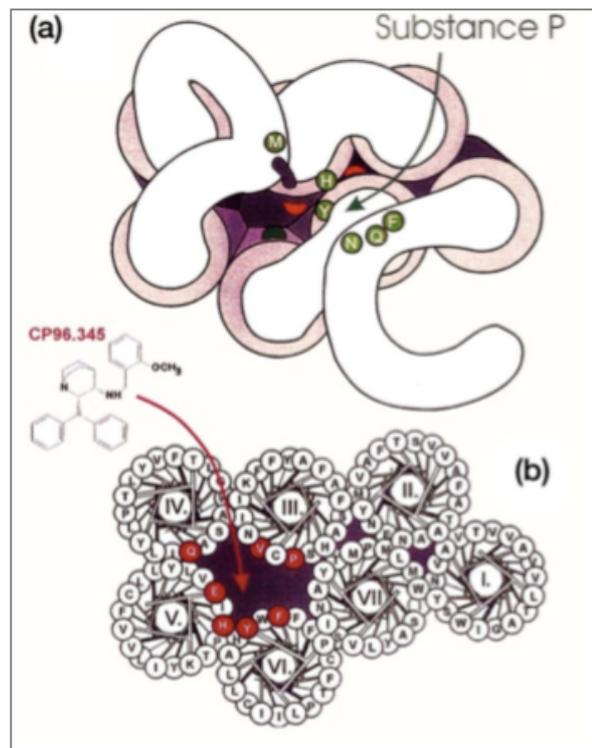


Figura 64: Representación esquemática de los sitios de unión para SP y el antagonista no peptídico CP-96,345 en el RNK1. **A)** Imagen que muestra la visión extracelular del RNK1 en la que se representan los bucles extracelulares y el extremo amino terminal. Los círculos verdes representan los residuos que interactúan con la SP. **B)** En la segunda imagen, los círculos rojos representan los sitios de unión del antagonista no peptídico CP-96,345. (Hokfelt, Pernow et al. 2001).

5.2-1 Distribución de la SP y acciones fisiológicas en el organismo.

Los datos de distribución y localización de la SP en el organismo han sido obtenidos mediante técnicas de HPCL o Cromatografía líquida de alta eficacia (*High performance liquid chromatography*), estudios inmunohistoquímicos y radioinmunológicos (Hökfelt, Lundberg et al. 1980), (Pernow 1983), (Maggio 1988).

La SP está ampliamente distribuida por el SNC y periférico, especialmente a nivel de las neuronas aferentes cuando actúa como neurotransmisor. En el SNC se encuentra expresada en neuronas, astrocitos, microglía y células endoteliales cerebrales. Se localiza en la corteza cerebral en las áreas somatomotora, somatosensorial, visual y olfatoria. Sin embargo a nivel subcortical se hallan los mayores niveles de este péptido: los núcleos caudado y putamen presentan una densidad muy elevada de somas celulares que expresan SP, presentando proyecciones axonales a la sustancia negra, siendo el área negroestriada una de las áreas de mayor concentración del péptido. También se encuentra en los núcleos amigdalinos del hipocampo, cápsula interna y septum. En el tronco del encéfalo se localiza entre los principales núcleos neuronales destacando el trigémino, y en la médula espinal a nivel de las astas posteriores (Satake and Kawada 2006). A nivel del sistema nervioso periférico, la SP se localiza en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios espinales, cadena cervical simpática y en los ganglios yugular, nodoso del vago y trigeminal (Beaujouan, Saffroy et al. 2000, Beaujouan, Torrens et al. 2004)

En el resto del organismo, la SP está ampliamente distribuida, localizándose, según los estudios realizados hasta la fecha, alrededor de los vasos sanguíneos o terminaciones nerviosas en la mayoría de órganos y tejidos: piel, folículos pilosos, glándulas sudoríparas, aparato respiratorio, genitourinario y cardiovascular, en los plexos mientérico y submucoso del sistema digestivo e incluso en la pulpa dentaria. Sin embargo, también se ha descrito la presencia de SP en la placenta, órgano carente de inervación (Muñoz, Pavón et al. 2010), (Sastry, Tayeb et al. 1981).

Se ha relacionado a la SP y al NK1R con múltiples acciones fisiológicas que a continuación se resumen:

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

A nivel cortical, la SP actúa como modulador de la actividad neuronal (Hökfelt, Lundberg et al. 1980, Hökfelt, Vincent et al. 1982). A nivel del tracto hipotálamo-hipofisario induce un aumento en la liberación de hormonas hipofisarias (Baertschi, Zingg et al. 1981) . La presencia de SP y NK1R en áreas como la amígdala sugiere su participación en el comportamiento emocional y la respuesta neuroquímica al estrés (Mantyh, Hunt et al. 1984, De Felipe, Herrero et al. 1998, Kramer, Cutler et al. 1998). En la médula espinal la SP está presente fundamentalmente en las neuronas de las astas posteriores.

SISTEMA VISUAL

Existe SP en todas las partes del sistema visual: ganglio de Gasser, nervio oftálmico, retina, iris, en los procesos ciliares con localización preferente subepitelial, vasos sanguíneos y úvea anterior (Unger, Butler et al. 1981), (Jotwani, Itoh et al. 1994). La SP se libera ante la presencia de sustancias químicas irritantes produciendo hiperemia, miosis y, secundariamente hipertensión ocular (Camras and Bito 1980).

SISTEMA GASTROINTESTINAL

La SP tiene un papel fundamental en el sistema gastrointestinal, conociéndose en la actualidad su distribución y función con bastante exactitud. Los tres subtipos de receptores de taquicininas se encuentran en las neuronas entéricas, el músculo liso intestinal, el epitelio, el sistema vascular y el sistema inmunitario entérico. Las funciones principales de la SP son: secreción de fluidos y electrolitos, motilidad intestinal, y función inmunitaria. (Wattchow, Furness et al. 1987), (Shimizu, Matsuyama et al. 2008).

En el esófago, la SP parece localizarse preferentemente en los plexos mientéricos y submucosos, siendo mucho más abundante en la región inferior del esófago que en la superior (Kuramoto, Oomori et al. 2004).

En el estómago la mayor concentración de SP se observa en el plexo mientérico y en la capa muscular longitudinal, sobre todo a nivel del cardias y antro (Pernow 1983).

En el intestino delgado se localiza de forma preferencial en la capa muscular circular, plexos submucoso y mientérico, en la muscularis mucosa y lámina propia. También existe SP asociada a los villi de la mucosa y en el tejido conectivo, así como en el epitelio. En el colon la mayor densidad se encuentra en el plexo mientérico y capa muscular circular.

En la vesícula las fibras que contienen SP predominan en los plexos ganglionares y musculares. En el hígado se observa SP tanto en el parénquima como en el tejido conectivo así como en el sistema vascular hepático. La inyección intravenosa de SP en perros produce una disminución del flujo biliar basal unido a una disminución en la excreción de ácidos biliares y electrolitos. La SP además bloquea la secreción de bilis inducida por la colecistoquinina. Las fibras aferentes procedentes del vago, las cuales expresan SP, producen mediante estimulación colinérgica una contracción de la musculatura lisa de la vesícula biliar (Sharkey, Williams et al. 1984). En el páncreas existe tanto a nivel exocrino como endocrino. Respecto al primero, la SP es un potente inhibidor de la secreción de las células ductales y un débil estimulante de la secreción de amilasas. Respecto a la función en el páncreas endocrino su respuesta es variable.

SISTEMA RESPIRATORIO

La SP se distribuye en el músculo liso, tejido conectivo y epitelio traqueobronquial. Los primeros en determinar la inmunorreactividad de la SP en el aparato respiratorio fueron Nilsson y colaboradores en el año 1977 (Nilsson 1977). A este nivel actúa como un potente broncoconstrictor y además tiene efecto vasodilatador sobre los vasos de la vía aérea, induce la secreción de moco y regula el mecanismo de aclaramiento mucociliar (Hauser-Kronberger, Hacker et al. 1993, Joos, De Swert et al. 2003).

SISTEMA CARDIOCIRCULATORIO

La SP es uno de los vasodilatadores más potentes que se conocen. Su administración provoca hipotensión y taquicardia (Evans, Dixon et al. 1988). Esta

acción parece producirse por la activación del NK1R en el endotelio. Además la SP promueve la liberación de factores endógenos a nivel endotelial como prostaciclina, óxido nítrico o factor relajante derivado del endotelio las cuales reducen el tono de la musculatura lisa (Stewart-Lee and Burnstock 1989).

En el corazón, se han identificado fibras nerviosas que contienen sustancia p en el corazón de diversos mamíferos incluido el hombre (Papka and Urban 1987). Estas fibras se distribuyen en vasos coronarios y sus ramas (Reinecke, Weihe et al. 1980), plexo perivascular de arteriolas, capilares vénulas, paralelas a las fibras miocárdicas auriculares y ventriculares y asociadas con el sistema de conducción (Weihe, Reinecke et al. 1981). También se han detectado fibras en las válvulas cardíacas Wharton, Polak et al. 1981).

SISTEMA UROGENITAL

La SP se expresa en el riñón y pelvis renal, así como en uréteres y en la vejiga donde todas las capas contienen SP. Es una de las moléculas con mayor poder vasodilatador y natriurético de los que se conocen. La infusión intrarrenal de SP produce un aumento del flujo renal, del volumen de orina y de la excreción de sodio (Alm, Alumets et al. 1978).

APARATO REPRODUCTOR

La SP se expresa en útero, ovarios y vagina así como en tejidos placentarios y cordón umbilical (Patak, Pinto et al. 2005). Se ha descrito la existencia de SP en células granulosas del ovario describiéndose el papel de esta taquicínina en la estimulación del ovocito sobre la contracción muscular de las trompas de Falopio y posterior implantación (Pintado, Pinto et al. 2003).

SISTEMA ENDOCRINO

La SP juega un papel muy importante en el ciclo menstrual regulando la ovulación de diferentes mamífero (Kerdelhué, Williams et al. 2000), (Kerdelhué, Lenoir et al. 2006). También se ha relacionado con los cambios producidos por el envejecimiento a nivel del eje hipotálamo-hipofisario (Yuan, Wen-Xia et al. 2005)

PIEL Y MUCOSAS

Se ha demostrado la existencia de SP en las terminaciones nerviosas de la piel y mucosas. Así existe inmunorreactividad para SP en la dermis papilar, epidermis, corpúsculos de Meissner, glándulas sudoríparas y vasos sanguíneos. Al estar también presente en las fibras C de la piel, se pone de manifiesto el papel fundamental que juega en la nocicepción (Dalsgaard, Jonsson et al. 1983), (O'Shaughnessy, McGregor et al. 1983)

SISTEMA INMUNE

En la década de los 90 y se demostró que ciertos tipos de células inflamatorias podían ser capaces de sintetizar y liberar TK, y que los NK1R desempeñaban un papel como mediadores de la migración extravascular de los granulocitos en respuesta a diferentes estímulos en los tejidos inflamados (Maggi 1997). La amplia distribución de las TK y sus receptores unido a su participación en una gran variedad de enfermedades inflamatorias e inmunológicas llevó a especular sobre su participación como parte integrante de la inmunidad innata (Pennefather, Lecci et al. 2004). El balance entre NP proinflamatorios y antiinflamatorios resulta crucial para mantener una situación inflamatoria basal de reposo y de autotolerancia. La ruptura de este equilibrio parece jugar un papel relevante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Reinke and Fabry 2006, Reinke, Johnson et al. 2006).

Los NP proinflamatorios como la SP favorecen una respuesta CD4+Th1 y promueven la inmunidad celular. Otros, como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) son potentes supresores de la inmunidad celular (Seiffert and Granstein 2002). La concentración de SP está muy aumentada en los focos inflamatorios en enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis ulcerosa o el asma. Se ha demostrado que la SP a través del NK1R retrasa la apoptosis y, por tanto, aumenta la supervivencia de los neutrófilos (Böckmann, Seep et al. 2001), macrófagos (Kang, Jeong et al. 2001) y precursores de linfocitos T y B (Zhang, Lu et al. 2000, Zhang and Paige 2003). También regula la actividad y función de células dendríticas (O'Connell, Pingle et al. 2005), mastocitos (Shaik-Dasthagirisahab, Varvara et al. 2013) y células NK (del inglés *natural killer*) (Lighvani, Huang et al. 2005)

SISTEMA HEMATOPEYÉTICO

La médula ósea adulta es la fuente de la que emerge el sistema inmune. Existen dos tipos de células madre pluripotentes en la médula ósea adulta: las células madre hematopoyéticas (CMH) que permiten el continuo recambio de células hematopoyéticas y las células madre mesenquimales (CMM) que son fuente de las células del estroma medular que participan en la diferenciación del microambiente hematopoyético para mantener y regular el crecimiento de las CMH. Las CMM son células pluripotentes y adultas con plasticidad hacia diversos linajes celulares como fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, adipocitos y mioblastos entre otros.

La hematopoyesis está regulada por mediadores como citoquinas, quemoquinas, neurotransmisores, neurohormonas, proteínas de la matriz extramedular así como por la interacción entre células. Las citoquinas han sido consideradas tradicionalmente como el prototipo de mediador de la hematopoyesis. Sin embargo, también existe una comunicación bidireccional con el sistema nervioso a través de la liberación de neurotransmisores desde las fibras nerviosas que inervan la médula ósea (Yamazaki and Allen 1990). Estos neurotransmisores interactúan con receptores específicos en las células de la médula ósea para liberar otros reguladores de la hematopoyesis, entre ellas las citoquinas. En este contexto, las TK son liberadas en la médula ósea como neurotransmisores así como de manera endógena por las propias células de la médula ósea. De este modo, tanto las TK como las citoquinas formarían parte del complejo entramado de la regulación de la hematopoyesis a través de diversos mecanismos: la liberación e inducción tanto de citoquinas como de TK, la activación de promotores de receptores taquicinérgicos como NK1R por parte de las citoquinas y por último la inducción de receptores de citoquinas por las TK (Figura 65). De esta forma, se demuestra la interconexión existente entre el sistema inmune y el nervioso para formar un eje de regulación neural-inmune hematopoyético (Greco, Corcoran et al. 2004). Por otro lado, las células del estroma medular que son fuente de moléculas que sostienen a las CMH (Müller-Sieburg & Deryugina, 1995) son particularmente relevantes por dos razones: son

una fuente no neuronal de neurotransmisores y expresan receptores específicos para TK (Müller-Sieburg and Deryugina 1995).

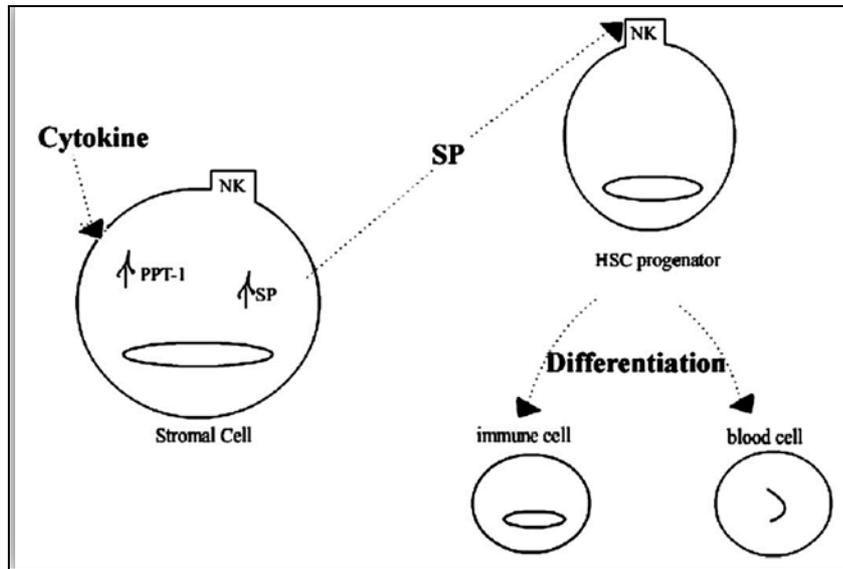


Figura 65. Regulación de la hematopoyesis por parte de la SP. La SP estimula la proliferación de progenitores e induce la producción de citoquinas en el estroma medular que inducen asimismo la expresión de TAC1 (PPT-1) y SP. Imagen tomada de (Liu, Castillo et al. 2007)

Existen terminaciones nerviosas en la médula ósea que contienen TK, siendo la SP y NKA los neurotransmisores principales que actúan como moduladores de la inmunidad y la hematopoyesis (Greco, Corcoran et al. 2004). Las dos fuentes de SP y NKA en la médula ósea son por un lado, las fibras nerviosas peptidérgicas, y por otro lado los liberados por las propias células que residen en la médula (Rameshwar, Ganea et al. 1993). Tienen efectos antagónicos sobre las CMH. La SP a través de NK1R promueve la proliferación y maduración celular en diversos puntos, mientras que NKA, a través de NK2R, inhibe esta proliferación celular tal y como se muestra en la figura 66.

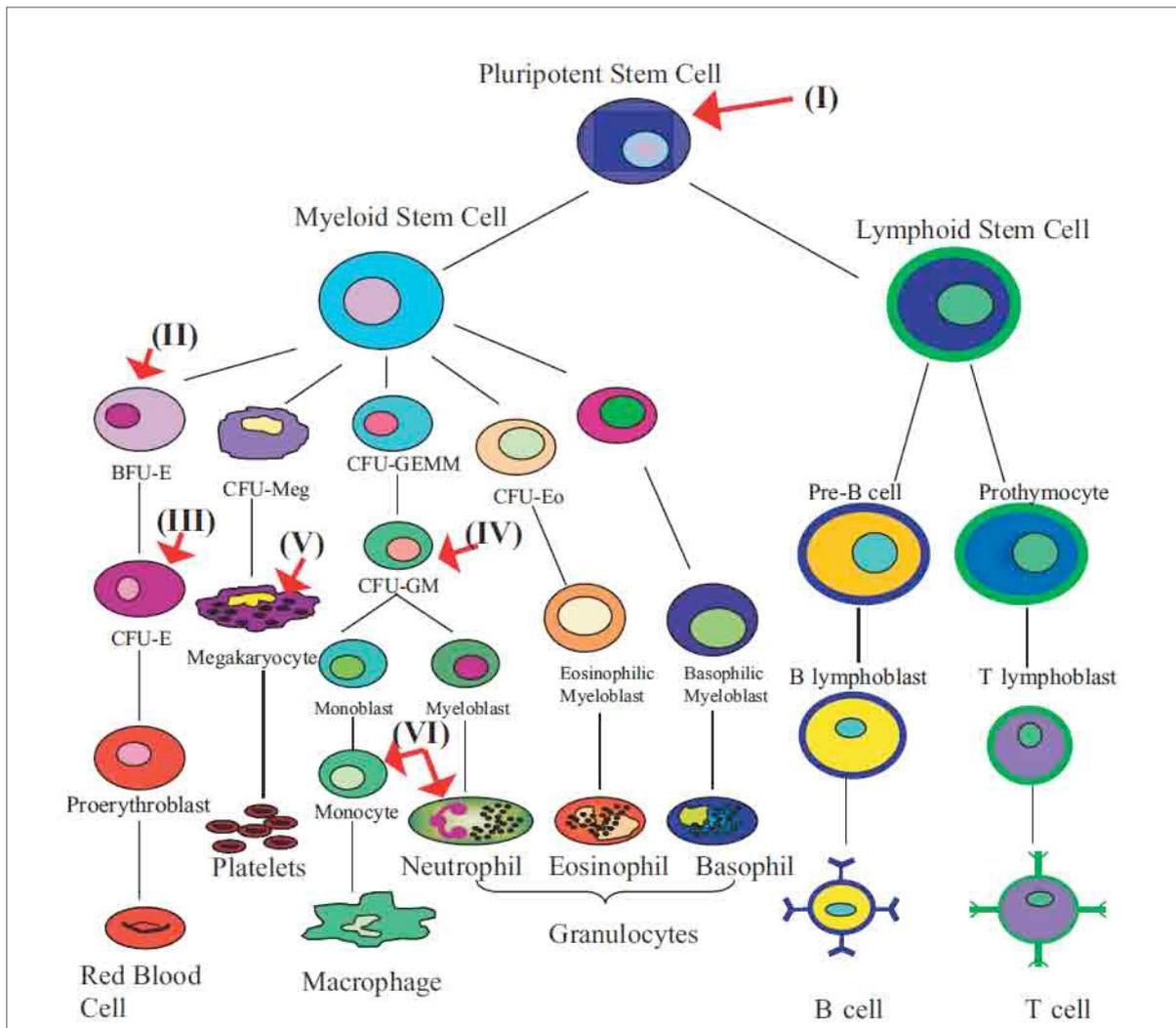


Figura 66. Resumen de las acciones hematopoyéticas de la SP y NK-A. (I) La SP tiene un efecto estimulador sobre los progenitores primitivos de la médula ósea (II) La SP estimula la proliferación de los progenitores eritroides precoces (BFU-E) y tardíos (CFU-E). (III-VI) La SP tiene un efecto sinérgico con diversas citoquinas para inducir la proliferación de las colonias mixtas mieloides-eritroides. Las flechas indican estimulación hematopoyética por la SP. Estos efectos son contrarrestados por la acción de la NKA (Imagen tomada de (Kang, Trzaska et al. 2004).

5.2-2 ACCIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LA SP

Las acciones fisiopatológicas que ejerce el complejo SP y RNK1 son múltiples. Se ha descrito su implicación en la regulación del sistema cardiovascular, la supervivencia y la degeneración neuronal; en la regulación de mecanismos respiratorios, en el control del movimiento y de la micción o en la regulación de la motilidad gástrica. También se ha demostrado su importante papel en procesos de

inflamación, dolor, depresión o cáncer (Hökfelt, Broberger et al. 2000, Muñoz and Coveñas 2013).

La SP se libera preferentemente en circunstancias patológicas por lo que los antagonistas de NK1R podrían ejercer su acción cuando el sistema SP-NK1R está regulado al alza y se produce una liberación incrementada de SP y/o una sobreexpresión de NK1R. Esto es lo que ocurre precisamente en procesos patológicos y enfermedades como la emesis, prurito, depresión, degeneración neuronal, enfermedad inflamatoria intestinal, en infecciones virales como el VIH o en el cáncer (Figura 67).

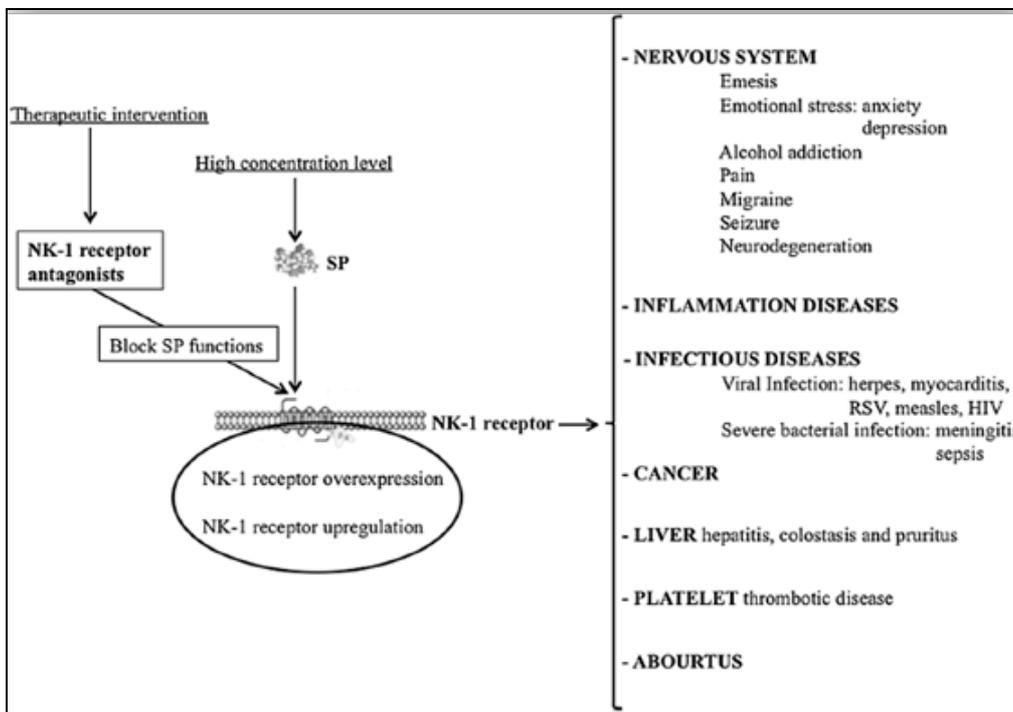


Figura 67: Implicaciones del sistema SP/NK1R en patología humana. Imagen tomada de (Muñoz and Coveñas 2014).

Describimos a continuación algunas de las principales patologías relacionadas.

CANCER.

Una de las acciones de la SP con mayor impacto en el campo de la investigación ha sido su capacidad mitogénica, comprobada en diferentes tipos celulares sanos: células del tejido conectivo (Nilsson, von Euler et al. 1985),

sinoviocitos (Lotz, Carson et al. 1987), fibroblastos (Ziche, Morbidelli et al. 1990) y linfocitos (Payan, Brewster et al. 1983). También se ha comprobado su capacidad para estimular la neovascularización a través de la inducción de proliferación endotelial (Ziche, Morbidelli et al. 1990). De hecho, la SP puede considerarse como un mitógeno cuasi-universal.

La presencia de SP en tumores humanos se identificó en la en la década de los 80, concretamente en tumores primarios del SNC (Allen, Hoyle et al. 1985). Una década después, Hennig y colaboradores no sólo demostraron la existencia de NK1R en células tumorales de astrocitoma, glioblastoma, carcinoma medular de tiroides, cáncer de mama y ganglioneuroblastoma, sino que además observaron que en la mayoría de estos tumores este receptor se expresaba tanto en los vasos sanguíneos intra como peritumorales. Este hallazgo planteó la hipótesis de que la SP participaba en la progresión y crecimiento de las células tumorales a través de su relación con los vasos sanguíneos de la vecindad, actuando de forma autocrina y paracrina en este contexto tumoral (Hennig, Laissue et al. 1995) (Reubi, Mazzucchelli et al. 1996). En 1996, Luo y colaboradores comprobaron *in vitro* por primera vez que concentraciones fisiológicas de SP inducían mitogénesis a través del NK1R en una línea celular de astrocitoma humano. Demostraron que esta respuesta mitogénica estaba mediada por la estimulación de la actividad de la tirosin-kinasa y las kinasas extracelulares reguladas por señal (ERK1 y ERK2) (Luo, Sharif et al. 1996). Pocos años después demostraron que el complejo SP-NK1R participaba en el desarrollo y crecimiento *in vivo* del tumor en modelo animal inyectando células tumorales de astrocitoma humano a ratones atímicos (Palma, Bigioni et al. 2000). Con estos hallazgos se abría un nuevo camino para el empleo de antagonistas de los NK1R como potencial tratamiento anticanceroso.

En la última década, numerosos trabajos entre los que destacan los realizados por el equipo del Dr. Muñoz, han puesto de manifiesto que tanto la SP como su receptor NK1R se expresan en diferentes tipos de células tumorales. En todas las líneas tumorales estudiadas la SP inducía proliferación celular y mitogénesis, habiéndose demostrado el efecto antitumoral derivado del bloqueo de los NK1R con diferentes antagonistas específicos de este receptor. Destacan los estudios llevados a cabo en líneas celulares de retinoblastoma (Muñoz, Rosso et al.

2007), neuroblastoma y glioma (Muñoz, Pérez et al. 2004, Muñoz, Rosso et al. 2005, Kast, Ramiro et al. 2016), leucemia aguda linfoblástica (Muñoz, González-Ortega et al. 2012), melanoma (Muñoz, Bernabeu-Wittel et al. 2011), adenocarcinoma gástrico y de colon (Rosso, Robles-Frias et al. 2008, Muñoz and Coveñas 2016) cáncer de mama (Bigioni, Benzo et al. 2005), cáncer de pulmón (Muñoz, González-Ortega et al. 2012), hepatoblastoma (Berger, Neth et al. 2014) o cáncer de páncreas (Muñoz and Coveñas 2015) entre otros.

Los estudios que relacionan el sistema SP-NK1R con la progresión tumoral se basan en varios pilares demostrados con estos trabajos de investigación:

- La SP está presente en las células tumorales tanto en el citoplasma como el núcleo.
- El receptor NK1R está sobreexpresado en las células tumorales y en mayor medida en los fenotipos tumorales de mayor malignidad.
- En las células tumorales la SP incrementa la fosforilación y activación de PKB o Akt suprimiendo los mecanismos de apoptosis. La liberación de interleuquinas, taurina y glutamato por el propio tumor induce un proceso inflamatorio el cual también incrementa los niveles de SP aumentando la capacidad proliferativa de las células tumorales.
- Las células tumorales tienen tasa de glucogenolisis 200 veces superior a la de las de sus tejidos originarios. El fenómeno por el que las células tumorales producen energía por una alta tasa de glucogenolisis seguida de una fermentación láctica sin anaerobiosis fue descrita por Warburg (Warburg 1956). La liberación de la SP proveniente de las células tumorales produce glucogenolisis y la glucosa obtenida sería utilizada por las células tumorales para aumentar su metabolismo. Los antagonistas del NK1R bloquean la glucogenolisis en las células tumorales contrarrestando así el efecto Warburg (Medrano, Gruenstein et al. 1994).
- La SP induce un cambio rápido en la forma celular produciendo evaginaciones citoplasmáticas o “blebbing” las cuales son importantes para la movilidad celular, migración celular y extensión e infiltración tumoral (Meshki, Douglas et al. 2009).

- La SP estimula la neoangiogénesis al estimular la proliferación de células endoteliales incrementando el flujo sanguíneo tumoral (Ziche, Morbidelli et al. 1990). En la mayoría de los tumores se ha comprobado que tanto SP como NK1R están presentes en los vasos sanguíneos intra y peritumorales y de hecho, durante la neoangiogénesis tanto la inervación tisular como NK1R están aumentados (Hennig, Laissue et al. 1995).
- La inflamación crónica se ha relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer. Así por ejemplo, el sistema SP-NK1R se encuentra sobreexpresado en las células epiteliales colónicas de pacientes con cáncer asociado a colitis (Gillespie, Leeman et al. 2013).

Por todo lo expuesto, el bloqueo de los receptores NK1R se ha convertido en una diana terapéutica antitumoral de creciente interés en los últimos años (Muñoz and Coveñas 2013), (Munoz, Covenas et al. 2015).

ENFERMEDADES INFLAMATORIAS.

El efecto proinflamatorio que ejerce la SP sobre las células epiteliales y del sistema inmune, ha puesto de manifiesto su participación en diversas enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio, gastrointestinal y musculoesquelético (O'Connor, O'Connell et al. 2004). Se ha encontrado un aumento en los niveles de SP y expresión de NK1R en el recto y colon de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal existiendo una correlación con la actividad de la enfermedad (Shimizu, Matsuyama et al. 2008). También se ha demostrado en la enfermedad mucocutánea inflamatoria crónica (González Moles, Esteban et al. 2009). Los pacientes con asma presentan un aumento en la expresión tanto de SP como NK1R en el árbol bronquial y parece jugar un papel importante en el desarrollo de hiperreactividad bronquial, inflamación de la vía aérea y tos (Joos, De Swert et al. 2003).

ENFERMEDADES DEL SNC

TRASTORNOS AFECTIVOS. Se ha confirmado la presencia de SP en el hipotálamo y amígdala, estructuras del sistema límbico involucradas en la regulación del comportamiento emocional (DeVane 2001). La SP desempeña un papel fundamental en la regulación de la afectividad emocional y respuesta neuroquímica al estrés, por lo que alteraciones en este complejo SP-NK1R podrían estar involucrados en la patogenia de la depresión y ansiedad entre otros trastornos psiquiátricos (Kramer, Cutler et al. 1998), (Kramer, Winokur et al. 2004). Se ha comprobado que los sujetos con depresión aguda presentan niveles plasmáticos de SP mayores (Bondy, Baghai et al. 2003), sintomatología esquizofrénica (Rimón, Le Grevés et al. 1984) y fibromialgia (Russell 2002). Todo esto sugiere que la SP está ligada funcionalmente al control de los fenotipos afectivos de una manera compleja (Pantaleo, Chadwick et al. 2010) (Pantaleo et al., 2010).

EMESIS: La SP está presente en el núcleo del tracto solitario y en el área postrema, ambas localizaciones están implicadas en el control de la emesis. Ya en 1981, Armstrong y colaboradores implicaron a la SP en el reflejo nauseoso (Armstrong, Pickel et al. 1981, Ades, Halyard et al. 2016) y posteriormente numerosos trabajos preclínicos y ensayos clínicos en humanos han corroborado el uso de antagonistas de NK1R para el control de los vómitos sin reacciones adversas significativas (Ades, Halyard et al. 2016)

EPILEPSIA. La SP juega un papel proconvulsiónante, demostrándose que, inyectada en el hipocampo de la rata, la SP disminuye el umbral de inicio de la actividad convulsiva, y de la misma manera el spantide II, un antagonista del receptor de la SP, es capaz de suprimir la actividad electroencefalográfica y prevenir el desarrollo de nuevas crisis en este grupo de ratas (Liu, Mazarati et al. 1999). Además, se ha comprobado que los ratones carentes del gen TAC1 presentan una mayor resistencia a la aparición de convulsiones, siendo éstas de

menor intensidad y duración y además presentan una recuperación más rápida tras las mismas (Liu, Cao et al. 1999). Estos datos demuestran el papel proconvulsivante de la SP. Sin embargo, el efecto anticonvulsivante de los antagonistas NK1R aún no ha sido probado en humanos.

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: Enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y corea de Huntington son enfermedades neurodegenerativas en las que se ha encontrado SP y NK1R en las áreas cerebrales implicadas en estos trastornos (Gillberg, Aquilonius et al. 1982), (Richfield, Vonsattel et al. 2002), (Sonomura, Nakamura et al. 2007). Aunque en estudios preclínicos parece que los antagonistas NK1R podrían tener efecto neuroprotector, aún no se han desarrollado ensayos clínicos en humanos que lo hayan demostrado.

EFFECTOS NEUROTRÓFICOS. El concepto de neurogénesis adulta se ha postulado como un mecanismo potencial por el cual el tejido neuronal dañado puede ser reemplazado mediante la activación y el desarrollo de células progenitoras neuronales. La capacidad de la SP de promover el crecimiento neuronal es un fenómeno bien conocido. Se ha demostrado que en el área cortical subventricular y en el giro dentado del hipocampo del cerebro de rata, áreas ricas en células madres neuronales, la introducción de SP induce un aumento en el número de células progenitoras neuronales (Park, Yan et al. 2007)

INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA.

Es uno de los ejemplos más notables del papel que la SP desempeña en procesos fisiopatológicos. Se cree que es consecuencia de la estimulación eléctrica, mecánica y química de las fibras C de las terminaciones de las neuronas sensoriales. Intervienen diferentes neurotransmisores, aunque es la SP el principal mediador (Lembeck and Holzer 1979, Pernow 1985). La SP activa el NK1R presente en las células endoteliales produciendo vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, extravasación plasmática y aumento de la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, facilitando por medio de éstas la migración transendotelial e

infiltración de los neutrófilos en el foco inflamatorio (Nakagawa, Sano et al. 1995). También presenta como ya hemos mencionado anteriormente actividad neuroinmunorreguladora sobre la inmunidad celular y humoral, estimulando la proliferación de células T, diferenciación de células B, degranulación de mastocitos y diapédesis leucocitaria (Krause, Takeda et al. 1992). Activa el factor de transcripción NF-kappaB, con un papel muy importante en la regulación de la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-8 (Fiebich, Schleicher et al. 2000). La SP también induce un aumento en la expresión de IL-2 por las células T (Calvo, Chavanel et al. 1992), e IL-1, IL-6 y TNF- α por astrocitos (Gitter, Regoli et al. 1994) y monocitos (Lotz, Vaughan et al. 1988). En modelos murinos se ha comprobado que el bloqueo de los NK1R protege al hígado del daño inflamatorio mediado por citoquinas (Bang, Sass et al. 2003) y reduce el daño por isquemia-reperfusión a nivel de la arteria mesentérica superior en ratas (Souza, Cara et al. 2000).

DOLOR.

La SP es uno de los principales neurotransmisores implicados en la transmisión de la sensación dolorosa y su posterior elaboración en el SNC. Produce eritema al dilatar los vasos cutáneos, y edema por descarga de histamina. Tras su liberación, la SP excita las neuronas nociceptivas en las astas dorsales de la médula donde activan los NK1R de las vías de transmisión del dolor hacia el SNC (Severini, Improta et al. 2002). También está involucrada en el proceso de integración del dolor a nivel central y en la generación del estrés y ansiedad que éste desencadena (DeVane 2001). Se ha comprobado que si se inyectan antagonistas de la SP en la médula espinal sobreviene una acción analgésica y se reduce el tiempo de acción frente a los estímulos dolorosos. Por otro lado, existe una relación entre la SP y los neurotransmisores opioides endógenos implicados en los procesos de analgesia del SNC.

El papel de SP-NK1R en nocicepción e hiperalgesia en modelos animales ha quedado demostrado con trabajos que muestran cómo la delección de TAC1 modera el dolor y previene la inflamación neurogénica (Cao, Mantyh et al. 1998) y estudios en los que suprimiendo NK1R se suprime el dolor inducido por estrés (De

Felipe, Herrero et al. 1998). Sin embargo, el uso de antagonistas de NK1R como analgésico no ha sido validado en los ensayos clínicos (Hill 2000). Estos resultados son llamativos, pues los trabajos preclínicos lo sugerían fuertemente. El papel, por tanto, de SP y NK1R en la modulación del dolor y la hiperalgesia es tal vez más sutil de lo que inicialmente se pensó.

INFECCIONES VÍRICAS

Se ha demostrado la implicación del complejo SP-NK1R en la patogenia de diferentes infecciones víricas, entre las que destacan la miocarditis (Robinson, Garza et al. 2009) (Robinson, Taffet et al. 2015) y la infección por VIH.

Se han encontrado niveles de SP elevados en el plasma de hombres y mujeres con infección por el VIH (Douglas, Lai et al. 2008). Además se ha comprobado que los macrófagos y linfocitos de pacientes infectados por este virus expresan niveles superiores de SP, lo que llevó hace ya más de una década a plantear la hipótesis de que la interacción del VIH con la SP podría tener relevancia en la inmunopatogénesis de la infección por el VIH y desarrollo del SIDA (Ho and Douglas 2004). Posteriormente se comprobó que el bloqueo de los NK1R con aprepitant ejercía un efecto anti-VIH1 en células mononucleares de sangre periférica, además de una sinergia con algunos inhibidores de la proteasa (Manak, Moshkoff et al. 2010). Recientemente se ha comprobado que la SP aumenta la expresión del VIH-1 en neuroesferas de origen fetal infectadas por este virus (Schwartz, Spitsin et al. 2013) y que la activación de NK1R por la SP contribuye al aumento de la infección por VIH en macrófagos al inducir la expresión de CD163 (Tuluc, Meshki et al. 2014).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

Estudios previos han demostrado que la SP puede tener un papel etiopatogénico en una gran variedad de fenómenos fisiológicos y fisiopatológicos. Se trata de un neuropéptido que pertenece a la familia de las taquicininas y señala a través de su receptor de mayor afinidad, el NK1R. Aunque inicialmente se pensó que tenía exclusivamente un origen neuronal, se ha demostrado su expresión en múltiples sistemas periféricos donde no sólo se distribuye en las terminaciones nerviosas sino que también, otros tipos celulares -como células enteroendocrinas, células epiteliales de la mucosa, endoteliales y células del sistema inmunitario- pueden secretarla. De hecho existe SP en la placenta, que es un órgano carente de inervación. Así mismo, se ha descrito la presencia de SP en el corazón lo que ha supuesto una modificación en el concepto clásico de inervación cardíaca, pues se ha comprobado que el control nervioso de este órgano es mucho más complejo que la simple regulación doble -adrenérgica y colinérgica- y que la inervación peptidérgica cardíaca juega un papel fundamental.

A pesar de los diferentes neurotransmisores y neuropéptidos claramente relacionados con la inervación cardíaca hay una falta de conocimiento de la distribución exacta de la SP en el corazón humano y de los mecanismos precisos que activan estas moléculas para intervenir en la patogénesis de múltiples patologías cardíacas. La evidencia que se ha acumulado hasta el momento sugiere que la SP desempeña una función esencial en la insuficiencia cardíaca, la miocarditis y el remodelado postinfarto siendo el centro y raíz de los diversos mecanismos que se ponen en marcha en estas situaciones así como en otras discrasias cardíacas.

Hasta el momento no hay estudios publicados en relación a la presencia y distribución de la SP en el corazón humano fetal. Sí existen trabajos que relacionan a este péptido con la corioamnionitis, el síndrome inflamatorio fetal o la prematuridad postulándose que ejerce una función esencial en el desarrollo embrionario. El conocimiento del patrón de expresión y distribución de esta

taquicinina y su receptor en el tejido cardiaco sano adquiere gran interés pues serviría como punto de partida para posteriormente establecer su implicación en diferentes situaciones patológicas como pueden ser las cardiopatías congénitas, arritmias fetales, miocardiopatías o insuficiencia cardiaca entre otras. Pero lo verdaderamente apasionante de este nuevo paradigma es la disponibilidad de moléculas antagonistas del NK1R que podrían tener una importante actividad terapéutica. De hecho, algunos de estos compuestos ya están siendo utilizados en la clínica habitual para el tratamiento de situaciones patológicas, como por ejemplo, los vómitos incoercibles inducidos por quimioterapia. Pero además se están desarrollando múltiples estudios con resultados prometedores para otros usos, incluidos el tratamiento del cáncer, la depresión o la miocarditis vírica.

Se podría por tanto afirmar que es profundamente necesario seguir trabajando en esta línea de investigación, y si la evidencia experimental continúa demostrando la importancia de la SP, la modulación de esta vía va a significar una estrategia crucial para el tratamiento y prevención de numerosas patologías cardiacas en el futuro próximo.

Esta tesis se centra en describir la localización y distribución de la SP y el NK1R en el corazón humano, desde la etapa fetal a la adulta.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis que nos planteamos en la elaboración de este trabajo es que, en el corazón humano, ya desde la vida fetal, se expresarían tanto la SP como NK1R atendiendo a un patrón histológico característico.

Los objetivos principales de la presente tesis son los siguientes:

1. Estudiar la expresión y localización de la sustancia P en tejido cardiaco humano sin alteraciones ni patología cardiaca, realizando una descripción detallada de su distribución en las distintas zonas del mismo.
2. Estudiar la expresión y localización del receptor NK1 en tejido cardiaco humano sin alteraciones ni patología cardiaca, realizando una descripción detallada de su distribución en las distintas zonas del mismo.

III. MATERIAL Y MÉTODO

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MÉTODO DE TRABAJO

1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio piloto observacional descriptivo anatómico-morfológico en el que se evalúa de forma semicuantitativa la expresión y distribución inmunohistoquímica de la SP y NK1R en el corazón.

1.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y TAMAÑO MUESTRAL.

La especie elegida en nuestro trabajo fue el ser humano en su etapa fetal, neonatal y adulta. Se revisaron todas las muestras de tejido cardiaco de fetos, neonatos y adultos procedente de autopsias incluidas en formol y obtenidas en el Hospital Virgen del Rocío desde el 1 de enero de 2012 hasta el 31 de diciembre de 2012. Del total de autopsias computadas en este año (117) se seleccionaron aquellas muestras de pacientes que cumplieran unas condiciones establecidas. Éstas quedan definidas en los criterios de inclusión que a continuación se detallan:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Autopsias de fetos, neonatos o adultos en los que no exista un diagnóstico de enfermedad o malformación cardiaca como causa de muerte.
2. Material histológico en buen estado de conservación, sin daños o artefactos en su procesamiento.
3. Ausencia de alteraciones detectadas en el estudio morfológico que impidan el análisis de todas las zonas cardiacas que queremos analizar.
4. Ausencia de alteraciones detectadas en el estudio histológico que puedan influir en la expresión de la SP y el NK1R: daño estructural, infiltrado inflamatorio o cualquier otro dato de actividad inflamatoria e isquemia cardiaca.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Autopsias de fetos, neonatos o adultos cuya causa de muerte esté relacionada con alguna patología cardíaca.
2. Autopsias de fetos, neonatos o adultos que recibieran tratamiento con esteroides
3. Material histológico con alteraciones anatómicas que impidan una correcta obtención de las zonas a estudiar
4. Material histológico con alteraciones histológicas de tipo inflamatorio, estructural o isquémico.
5. Material histológico en mal estado de conservación.

Tras descartar las muestras de pacientes que presentaran algún criterio de exclusión, los casos elegibles o que pudieran ser incluidos en la investigación se redujeron a 33. De esta manera se conseguía una población de estudio seleccionada evitando posibles factores de confusión que pudieran artefactar o falsear los resultados obtenidos.

Por último, de estos 33 se seleccionó una muestra representativa constituida por 10 autopsias que componen nuestra muestra de estudio final. Para ello se ordenaron todas las piezas por número de autopsias y se extrajo la muestra de estudio. Para asegurar la representatividad de la misma, se seleccionaron las autopsias a través de un muestreo aleatorio simple. No existe como vemos, cálculo previo del tamaño muestral porque al tratarse de un estudio descriptivo y al realizar una técnica de muestreo de forma probabilística queda asegurada la representatividad de la muestra. Por tanto, los resultados obtenidos pueden inferirse a las 33 piezas anatómicas.



1.3. NÚMERO DE MUESTRAS Y DEFINICIÓN DE LAS ZONAS A ESTUDIAR

De cada caso del estudio obtenemos 9 muestras diferentes de tejido cardiaco, correspondientes a las distintas zonas que queremos estudiar:

Las zonas sujetas a estudio fueron:

- a) Nodo sinoauricular (Nodo SA).
- b) Nodo auriculoventricular (Nodo AV).
- c) Pared cardiaca de aurícula derecha (AD)
- d) Pared cardiaca de aurícula izquierda (AI).
- e) Pared cardiaca de ventrículo derecho (VD).
- f) Pared cardiaca de ventrículo izquierdo (VI).
- g) Pared de arteria coronaria.
- h) Tejido valvular.
- i) Pared de arteria aorta a nivel de l

A su vez de cada zona de tejido cardiaco estudiamos tres muestras correspondientes a la tinción con SP, NK1R, y tinción con hematoxilina-eosina.

Control de calidad

En cada proceso de inmunohistoquímica se incluyó una muestra de placenta como control positivo tanto de SP como de NK1R, previamente analizado, valorado, validado y publicado (Muñoz, Pavón et al. 2010), con el fin de asegurar un rendimiento correcto de todos los reactivos aplicados. También se incluyó una muestra como control negativo de especificidad del anticuerpo sustituyendo el anticuerpo primario por suero.

De esta manera, el número total de muestras estudiadas ha sido 270.

1.4. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio se ha realizado siguiendo los principios éticos para las investigaciones en seres humanos según la Declaración de Helsinki de 1964, actualizada en posteriores revisiones (World Medical 2013). Se han seguido las normas de Buena Práctica Clínica dictadas por la Conferencia Internacional de Armonización de Directrices sobre Buena Práctica Clínica y los requisitos de las Autoridades Sanitarias Españolas establecidos en el Real Decreto 711/2002 de 19 de Julio. También se han cumplido las Pautas Éticas Internacionales para la investigación biomédica en seres humanos del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas del año 2002. (Council for International Organizations of Medical 2002)

Se garantizará la protección de la intimidad personal y el tratamiento confidencial de los datos personales que han resultado de la actividad de investigación biomédica, conforme a lo dispuesto en la Ley 41/2002, de 14 de noviembre y sus modificaciones (*Ley 41/2002* 2002) y en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre. (*Ley Orgánica 15/1999* 1999). Todo esto se llevó a cabo mediante la anonimización de los datos a través de la codificación de los pacientes al introducirlos en una base de datos informatizada, de manera que solo fueran identificables por los investigadores.

Se solicitó la valoración del proyecto de tesis por parte del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío, con informe valorable con fecha de 28 de enero de 2014 (Anexo I). También se obtuvo, tras la solicitud de biorecursos al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, un acuerdo de cesión de las muestras biológicas tras haber sido informada esta de forma positiva por el Comité Científico y de ética del citado Biobanco. Según este acuerdo, además de la legislación arriba referida, la investigación realizada en este estudio ha tenido que hacer uso de las muestras biológicas con la normativa especificada para dichos fines: Ley 14/2007 de 3 de Julio (*Ley 14/2007*) y Real Decreto 1716/2011, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica (*Real Decreto 1716/2011* 2011) (Anexo II).

La información podrá ser requerida por el Comité de Ética de la Investigación o por la autoridad sanitaria pertinente.

2. MATERIAL DE ESTUDIO Y TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

2.1. Material biológico: anticuerpos y tejido cardiaco.

ANTICUERPOS

Se emplearon los siguientes anticuerpos para el estudio inmunohistoquímico:

- Anticuerpo policlonal de conejo anti NK1R (Sigma-Aldrich, España: Referencia S8305 y Lote 083M4759 de 2014; 2 ml). Se utilizó una solución de anti NK1R y diluyente en una proporción de 1:1000.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti Sustancia P (Sigma-Aldrich, España: Referencia S1542 y Lote 030M4767 de 2014; 2 ml). Se utilizó una solución de anti SP y diluyente en una proporción de 1:2000.

TEJIDO CARDIACO

Las muestras de tejido cardiaco se obtuvieron del depósito de material histológico del Hospital Universitario Virgen del Rocío, solicitando todos los Biorecursos al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía según el procedimiento establecido y contando siempre con la colaboración del Departamento de Anatomía Patológica de dicho centro.

2.2. Material fungible y de inventariable: procesamiento de muestras y descripción de inmunohistoquímica indirecta.

Para el procesamiento de las muestras y la técnica de inmunohistoquímica se utilizaron los materiales que a continuación se detallan siguiendo el siguiente procedimiento:

- a) **Fijación de las muestras en formaldehído al 4%.**
- b) **Tallado de las piezas cardíacas.**
- c) **Inclusión de las muestras en bloques de parafina** según el protocolo habitual del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío.
- d) **Corte y desparafinado de las muestras.** Se realizaron cortes entre 3-5 μm con un micrótopo y se montaron en portaobjetos cargados electrostáticamente destinados a inmunohistoquímica. Las muestras de tejido parafinado se incubaron durante 24 horas en la estufa a 37°C y a 60°C durante los 30 minutos previos a la realización de la inmunohistoquímica.
- e) **Recuperación antigénica inducida por calor.** La recuperación del epítopo se realizó mediante el sistema Dako PT link (Dako, España) junto con la rehidratación del tejido. Para este proceso se utilizaron las soluciones incluidas en el kit de inmunohistoquímica EnVision™ FLEX solución de recuperación antigénica, pH bajo (50x) tapón de citrato (pH 6.1) (código K8005/DM829), diluida en agua destilada (1:10), durante 20 minutos a 96°C. Posteriormente, y ya a 65°C se realizó el lavado con solución EnVision™ FLEX Buffer de lavado (20x) (Código K8007/DM831), tamponada con solución Tris diluida con agua destilada (1:20) y a temperatura ambiente, durante 5 minutos.
- f) **Procedimiento automatizado de tinción inmunohistoquímica en analizador Autostainer Link.** Preparación de los reactivos. El procesamiento y tinción del tejido se realizó de forma automatizada y estandarizada en DakoAutostainer Link analizador (Dako, España), mediante kit de inmunohistoquímica comercializado EnVision™ FLEX, High pH,(link) (Dako, España). Las soluciones que se incorporaron directamente al analizador fueron:
 - EnVision™ FLEX reactivo bloqueante de peroxidasa (código SM801): para la inhibición de la peroxidasa endógena.
 - EnVision™ FLEX/HRP (código SM802): dextrano unido a moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra contra inmunoglobulinas de conejo.
 - EnVision™ FLEX + rabbit (linker) (código K8009/SM805): para la

incubación de cortes con anticuerpo secundario.

- EnVision™ FLEX Hematoxilina (código K8008/SM806): para la realización de la contratinción.
- EnVision™ FLEX Buffer de lavado (20x) (Código K8007/DM831)

Además fue necesaria la preparación de las siguientes soluciones:

- EnVision™ FLEX Sustrato buffer (código SM803) y EnVision™ FLEX Cromógeno DAB+ (diaminobenzidina) (código DM827) en una proporción de 1 gota de cromógeno por cada 20 ml de sustrato.
- Dilución de anticuerpos policlonales primarios de conejo (anticuerpo antisustancia P (Referencia S1542, Sigma Aldrich, España) en proporción 1:2000 y anti NK1R (Referencia S8305, Sigma Aldrich, España) en proporción 1:1000, con solución EnVision™ FLEX Diluyente de anticuerpo (código K8006/DM830).

Se programó en el software del autoanalizador, los pasos de tinción y los tiempos de incubación de los cortes en inhibidor de la peroxidasa endógena, en antisuero primario específico para cada anticuerpo, en anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, en el revelador con diaminobencidina y en la tinción de hematoxilina.

g) Deshidratación del tejido y montaje.

Una vez finalizado el procedimiento de automatizado con la contratinción con hematoxilina, se llevaron las muestras a agua destilada, y a continuación, se realizó la deshidratación de las muestras mediante el paso de los portaobjetos por una batería de alcoholes a concentración creciente: 60% (30 segundos), 70% (30 segundos), 80% (30 segundos), 90% (5 minutos), 96% (5 minutos), 100% (5 minutos). Finalmente se pasaron las muestras por tres cubetas de xiloles, para eliminar el alcohol: de forma rápida en las dos primeras y en la tercera, el tiempo necesario hasta el montaje. A cada cristal sacado del xilol, se le asigna un cubreobjetos al que se le ha añadido pegamento Pertex. Tras el secado, las muestras están preparadas para la visualización del resultado con el microscopio óptico.

h) Visualización de las muestras al microscopio

El microscopio utilizado fue el modelo Olympus BX61 dotado con objetivos de

diferentes aumentos (4X, 10X, 20X, 40X, 60X, 100X) acoplado a una cámara fotográfica digital Olympus modelo DP72. Se obtuvieron fotografías de las muestras más representativas. Para el procesamiento de las imágenes se empleó el software *CellSensDimension* (versión 1.4, 2010, Olympus Corporation). Las imágenes del apartado resultados, se obtuvieron mediante la opción que ofrece este programa de edición fotográfica de superponer diferentes imágenes obtenidas varios planos del eje Z (separados entre sí por 0.1 μm), integrando los diferentes puntos enfocados de cada plano en una sola imagen final.

2.3. Valoración e interpretación de los resultados

Las muestras fueron valoradas e interpretadas con la colaboración de un facultativo especialista de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Para cada uno de los casos de este estudio se valoró la expresión inmunohistoquímica de SP y NK1R de forma sistemática en los tipos celulares diferentes presentes en cada pieza cardiaca seleccionada.

Para la interpretación inmunohistoquímica, en cada muestra se puntuó tanto la intensidad como la extensión de la tinción mediante estimación visual, para cada uno de los elementos histológicos ya definidos, empleando para ello una escala semicuantitativa previamente definida y de uso habitual conocida como método Allred.

En este sistema, los criterios de valoración de extensión e intensidad son los siguientes:

- **EXTENSIÓN:** expresado en porcentaje de células con inmunoreacción a SP o NK1R con respecto del total de células:

EXTENSIÓN	
0	0%
1	< 1%
2	1 - 10 %
3	11% - 33 %
4	34% - 66%
5	> 67%

• INTENSIDAD:

INTENSIDAD	
0	Nula
1	Débil
2	Intermedia
3	Fuerte

De la suma de ambos parámetros, se obtiene una puntuación final en un rango que oscila entre 0 y 8. La positividad de la expresión de SP y NK1R, fue determinada si la tinción a nivel nuclear y/o citoplasmática, era positiva en al menos el 10% de las células.

Se estableció una gradación de la tinción inmunohistoquímica en función de la puntuación total obtenida:

- Tinción negativa: puntuación Allred menor o igual a 2.
- Tinción positiva intermedia: puntuación de Allred igual a 3 ó 4.
- Tinción positiva alta: puntuación de Allred igual o mayor a 5.

Este sistema de evaluación que originalmente fue definido para la valoración semicuantitativa de la expresión inmunohistoquímica de la expresión de receptores hormonales en el cáncer de mama (Allred, Clark et al. 1993), (Allred, Harvey et al. 1998) se ha extendido en la actualidad como instrumento para la valoración de la tinción inmunohistoquímica de la expresión de diversos biomarcadores en múltiples tejidos (Balan, Simion et al. 2011), (Baştürk, Kement et al. 2012), (Bjørndal, Larsen et al. 2011).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE DE CASOS Y DEFINICIÓN DE LAS ZONAS ESTUDIADAS.

La distribución de los casos seleccionados en cuanto al origen de la muestra de tejido cardiaco en función de la causa de muerte y la edad fue la siguiente:

EDAD	CAUSA MUERTE	PESO CORAZON (gramos)
21 semanas	I.V.E, S. Down	3
23 semanas	Corioamnionitis	3,7
25 semanas	Desprendimiento prematuro de placenta (DPP)	4
34 semanas	Insuficiencia fetoplacentaria	18
37 semanas	Nudo de cordón umbilical	17
38 semanas	DPP	15
40 semanas	DPP	27
40 semanas	Muerte súbita	25
54 años	Hepatocarcinoma	400
55 años	Shok postransplante hepático	280

Tabla 9. Serie de casos seleccionados, clasificados por edad, peso del corazón y causa de la muerte

De cada uno de los casos de estudio hemos obtenido 9 muestras diferentes de tejido cardiaco tal y como se explicó en el apartado Material y Métodos. A continuación se describirán los resultados obtenidos atendiendo a la siguiente clasificación:

- Paredes del corazón
- Sistema de conducción
- Arterias coronarias
- Grandes vasos

2. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA.

La tinción con hematoxilina-eosina de cada caso estudiado permitió corroborar la adecuada conservación y estructura de las distintas zonas estudiadas del tejido cardiaco, descartando la presencia de alteraciones histológicas importantes.

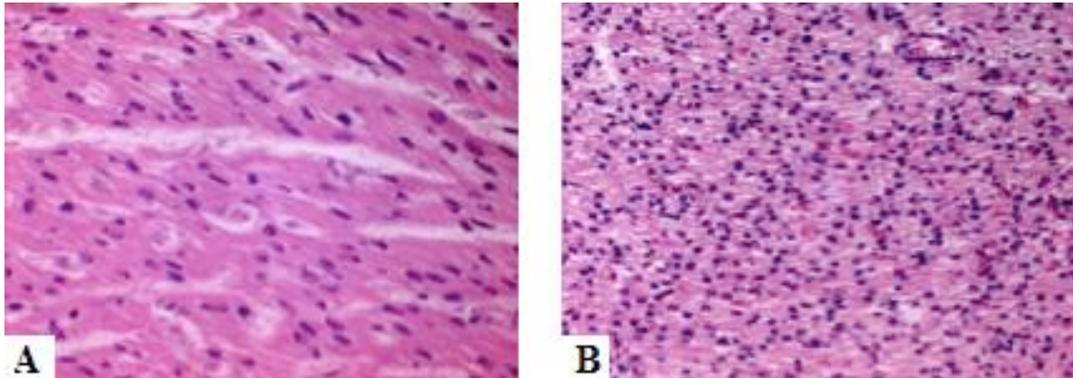


Figura 68: Microfotografía de tejido cardiaco: miocardio de ventrículo derecho, teñido con hematoxilina-eosina. A) Neonato de 34 semanas de edad gestacional (40x). B) Feto de 25 semanas (20x)

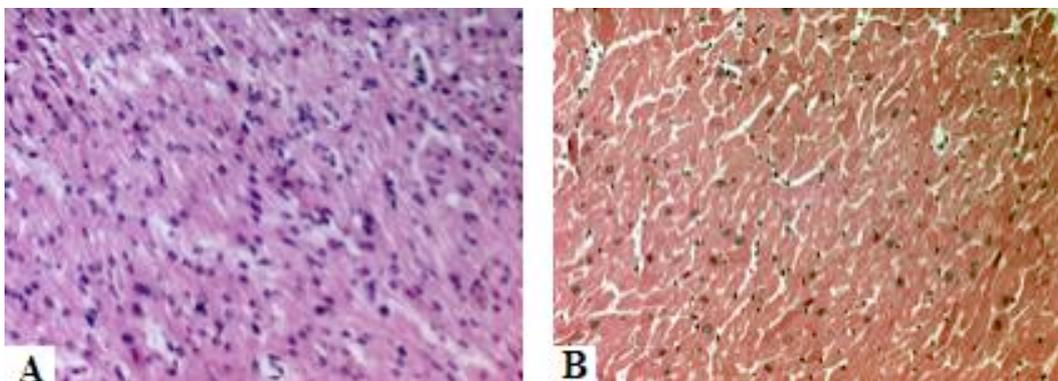


Figura 69: Microfotografía de tejido cardiaco: miocardio de ventrículo izquierdo, teñido con hematoxilina-eosina. A) Feto de 25 semanas de edad gestacional (20X). B) Adulto (20X)

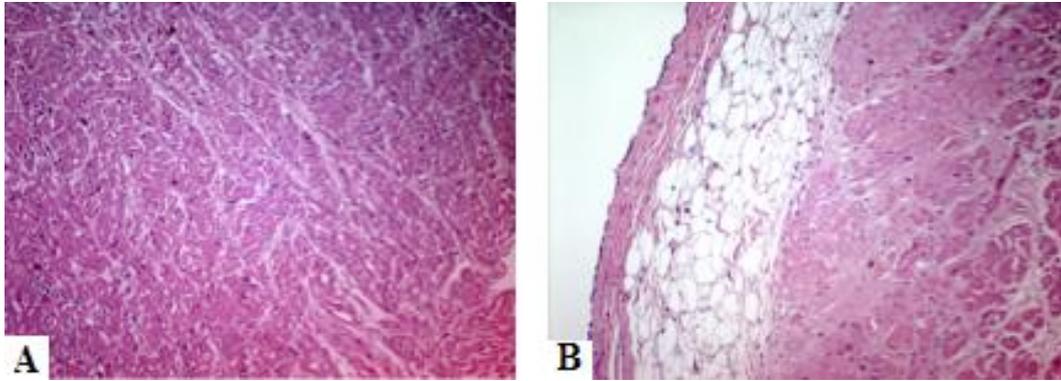


Figura 70: Microfotografía de tejido auricular. A) Miocardio AI (10x) adulto. B) Epicardio corte AD.(10x) caso 6 adulto.

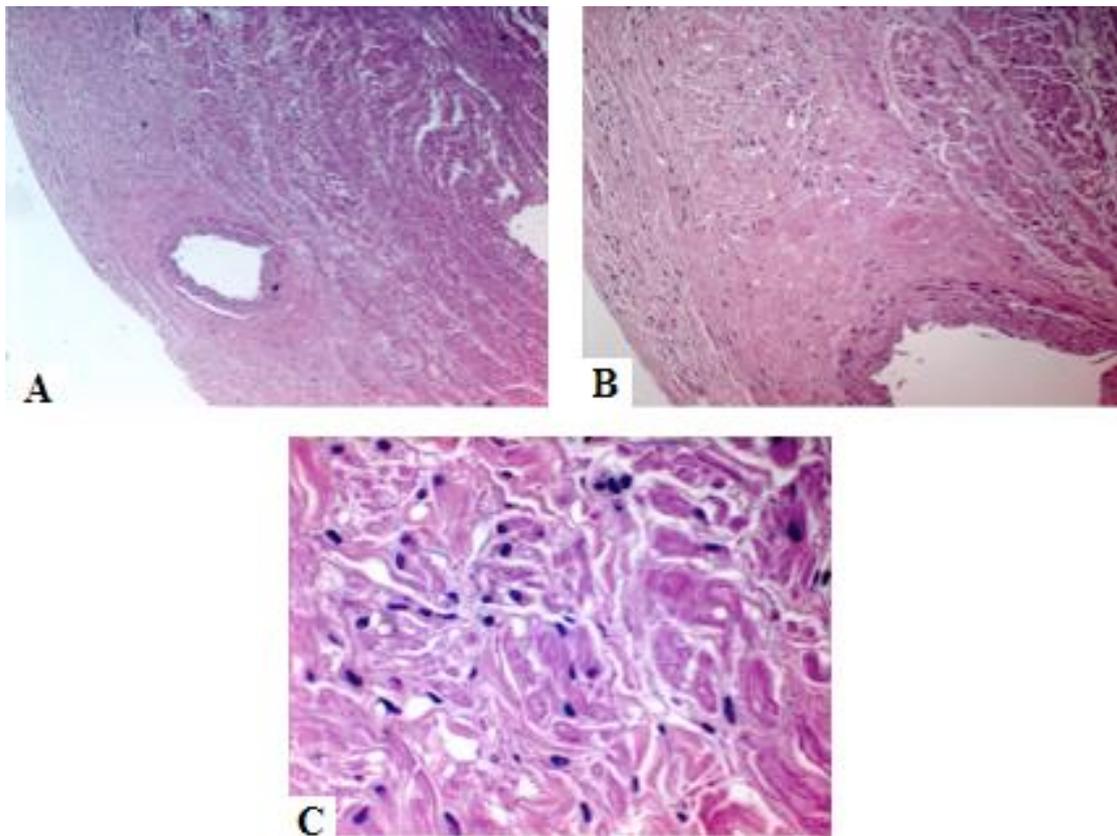


Figura 71: Microfotografía del tejido de conducción cardiaco correspondiente al nódulo sinusal de un corazón adulto. A) 4x B) 10x C) 40x

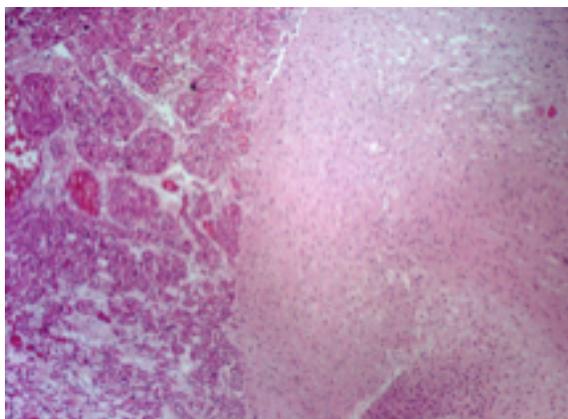


Figura 72: Microfotografía de tejido de conducción cardíaco correspondiente al nodo auriculoventricular de neonato de 34 semanas (4X)

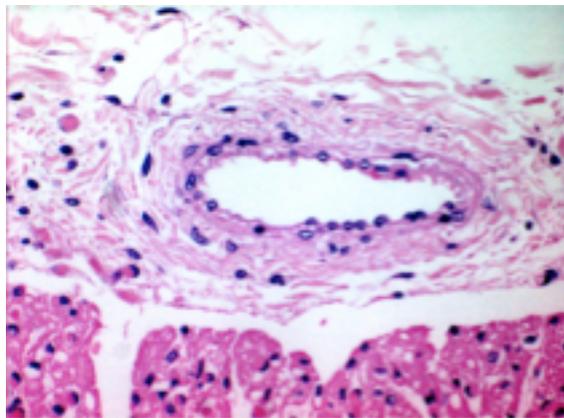


Figura 73: Microfotografía de arteria coronaria de neonato de 38 semanas (40x)

3. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA SP

3.1. PAREDES DEL CORAZÓN

3.1.1. Miocardio de aurícula derecha

Adulto

El miocardio de la **aurícula derecha de corazón adulto** presenta una intensa expresión de SP en la totalidad de las células observadas. Más de un 70% presentan una expresión intensa de SP tanto a nivel de la membrana nuclear como en el interior del núcleo (++/+++). A nivel citoplasmático encontramos expresión de la SP en todas las células del miocardio con una intensidad menor a la nuclear (+/++). Obsérvese en la imagen el patrón nuclear de expresión, que en ocasiones es más intenso a nivel de la membrana perinuclear (Figura 74-D).

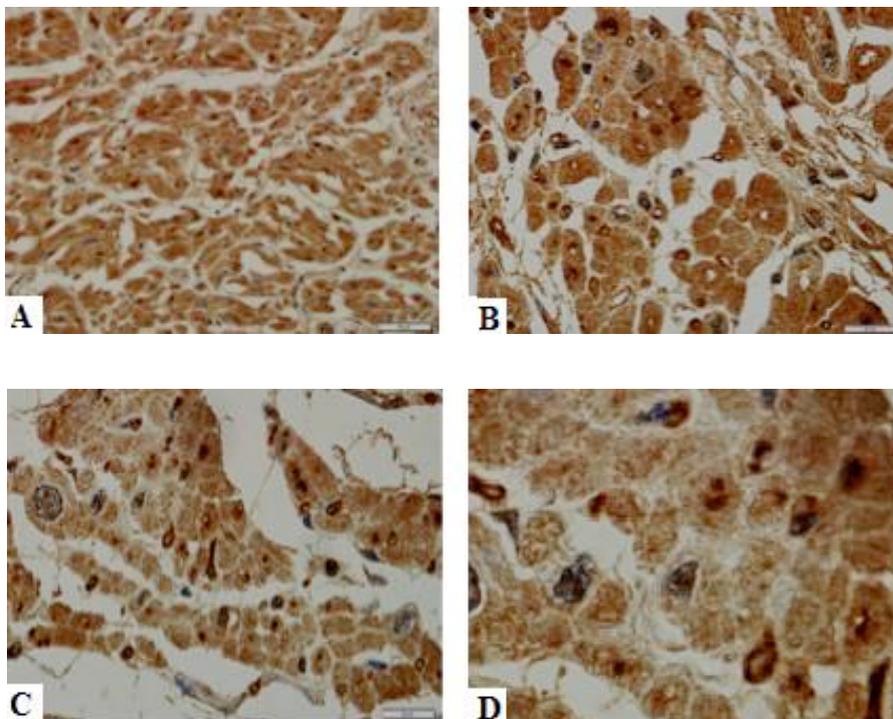


Figura 74. Inmunorreactividad de la SP en el miocardio de la aurícula derecha de corazón adulto. A) 40X. B) 100X C) 100X D)Detalle de imagen C.

Feto y neonato

El miocardio de la **aurícula derecha de corazón de fetos y neonatos** presentan expresión de SP en la totalidad de las células observadas. Menos del 10% presentan una expresión de SP a nivel nuclear (++) mientras que el 100% de las células observadas expresan SP a nivel citoplasmático con una intensidad variable (+/++).

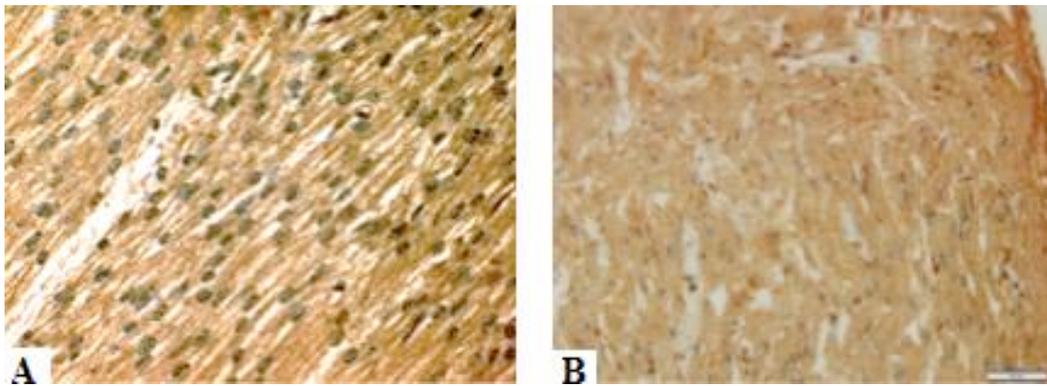


Figura 75: Expresión inmunohistoquímica de SP en el miocardio de la aurícula derecha. A) Feto de 25 semanas (40X), B) RNT (40X).

3.1.2. Miocardio de ventrículo derecho

El ventrículo derecho presenta una expresión de SP menos intensa que la observada en la aurícula derecha. Tanto en **fetos como en neonatos** la expresión de SP es esencialmente citoplasmática con una intensidad moderada(++) y constante. La mayoría de los núcleos, por el contrario, no expresan SP como observamos en la imagen (Figura 75) por lo que las puntuaciones de Allred obtenidas para valora la expresión nuclear de SP en fetos y neonatos es baja (2-3). En **adultos**, aumenta la proporción de núcleos que expresan SP observándose unas puntuaciones de Allred positivas intermedias. En la Figura 76 podemos observar cómo la proporción de núcleos teñidos aumenta en relación directa a la edad. Nótese que la mayoría de estructuras con aspecto nuclear teñidas con intensidad alta y forma circular corresponden a la irrigación de las células miocárdicas (capilares, vasos) y no al núcleo del miocito el cual, en estas imágenes no está teñido y posee una forma más irregular (Figura 76).

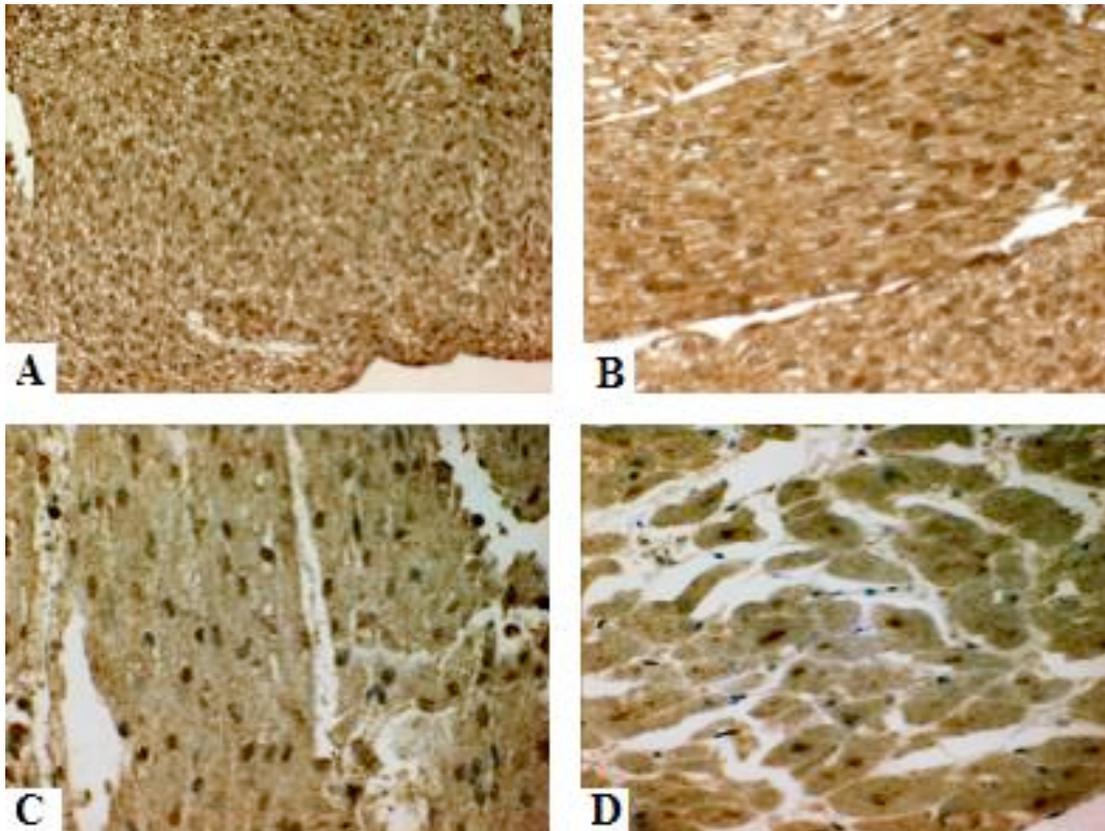


Figura 76. Expresión inmunohistoquímica de SP en ventrículo derecho humano. A) Feto de 25 semanas (20X). B) Feto 25 sem (40X). c) Neonato a término (40x) D) Adulto (40x)

3.1.3. Miocardio de aurícula izquierda

El miocardio de la aurícula izquierda presenta un patrón de expresión de SP citoplasmático en el feto y neonato y nuclear en el adulto. A nivel citoplasmático, los miocitos, tanto de fetos como de neonatos, presentan una inmunorreactividad constante, extensa y moderada con una puntuación de Allred positiva alta (5 a 6). Sin embargo, la tinción es negativa o débil a nivel nuclear en todos los fetos y neonatos que se han analizado con una escasa proporción de núcleos teñidos (Figura 77-A y 77-B). En adultos, la expresión citoplasmática es positiva intermedia con una intensidad débil-moderada (+/++). Por el contrario, existe una mayor proporción de núcleos con tinción positiva e intensidad fuerte.

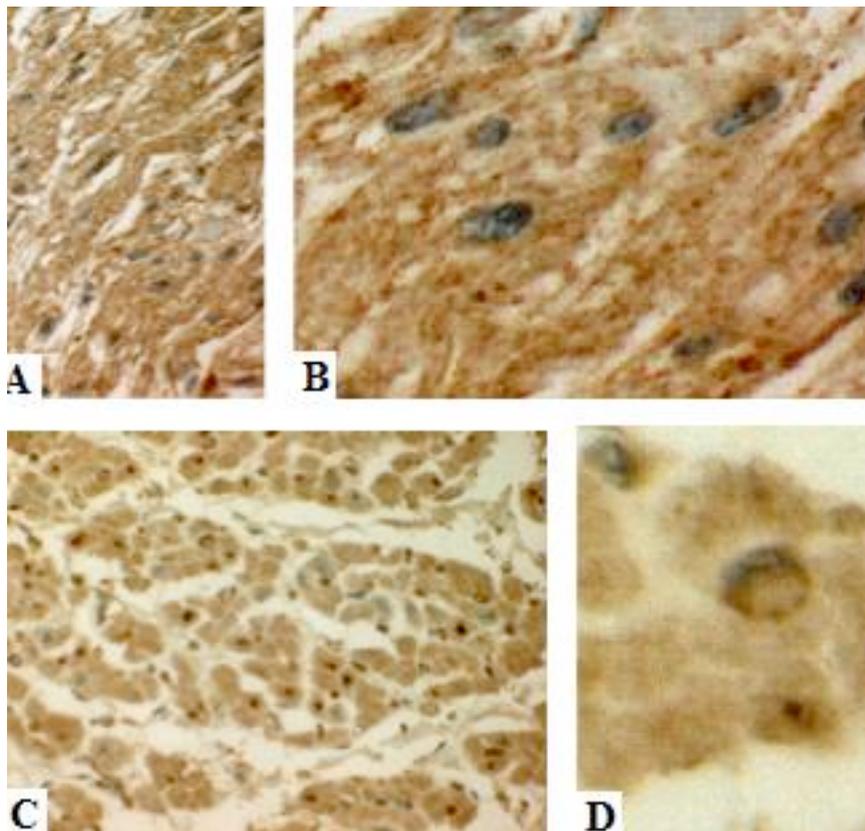


Figura 77. Inmunorreactividad de la SP en el miocardio de la aurícula izquierda. A) Corte longitudinal de miocardio de neonato de 34 semanas (40X). B) Detalle de imagen A. C) Corte transversal de miocardio de adulto (40X). D) Detalle de imagen c.

3.1.4. Miocardio de ventrículo izquierdo

Fetal

El miocardio del ventrículo izquierdo de las muestras correspondientes a corazones fetales muestra un patrón de expresión de SP moderada a nivel citoplasmático. No existe, como ocurre en el resto de miocardio fetal, inmunoexpresión nuclear.

Neonatos y adultos.

Las muestras de ventrículo izquierdo tanto de neonatos como adultos muestran inmunoexpresión fundamentalmente a nivel de las células del intersticio correspondientes a pequeños vasos sanguíneos. El citoplasma de los miocitos del ventrículo izquierdo de neonatos y adultos presenta una expresión menos intensa. Respecto a la inmunoexpresión nuclear también es negativa o débil en el miocardio de ventrículo izquierdo de neonatos y adultos.

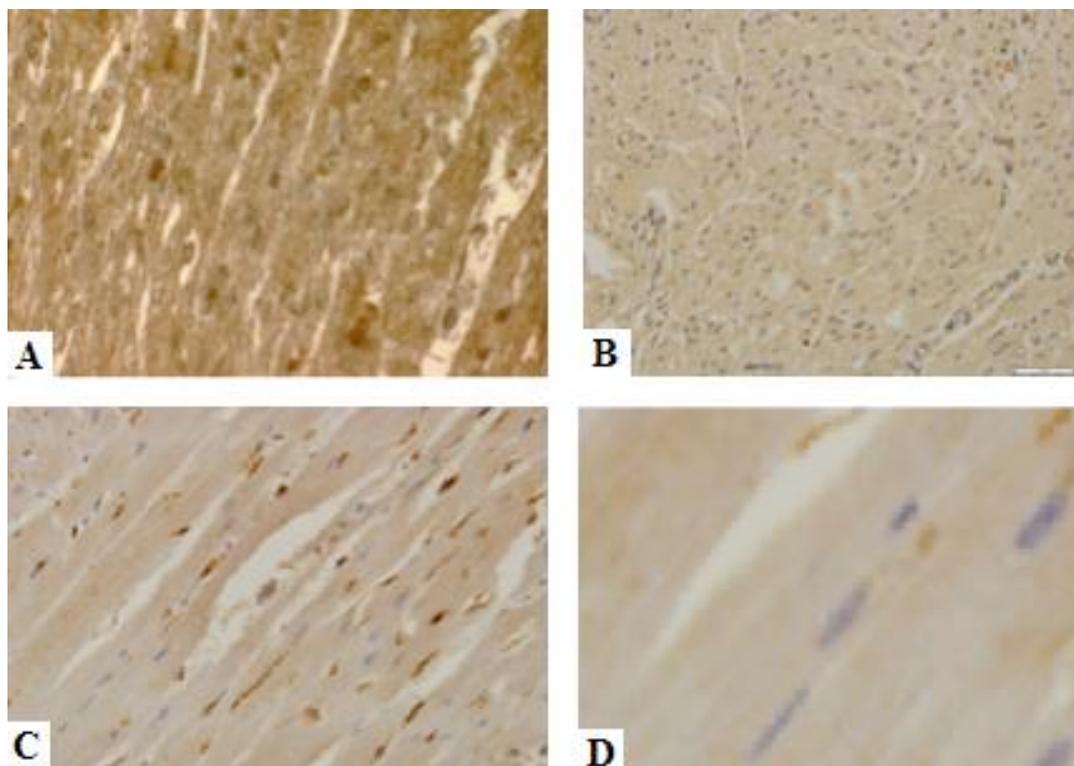


Figura 78. Expresión inmunohistoquímica de SP en el ventrículo izquierdo. A) Feto de 25 semanas (40X). B) Neonato de 34 semanas (40x). C) Adulto (40X). D) Detalle de la imagen C. Nótese la ausencia de inmunoexpresión a nivel del núcleo del cardiomiocito

3.2. EPICARDIO

Las células mesoteliales del epicardio expresan SP de forma intensa y constante en todas las muestras observadas, tanto de fetos, neonatos como adultos. Esta inmunoexpresión es alta (puntuación de Allred: 8) tanto a nivel nuclear como a nivel citoplasmático (puntuación de Allred: 5). El tejido conjuntivo (adipocitos, fibras elásticas) no expresan SP ni a nivel nuclear ni citoplasmático.

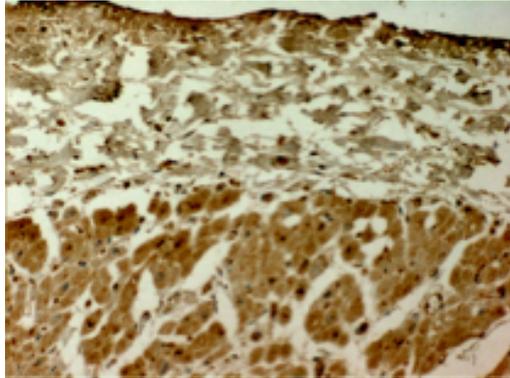


Figura 79: Expresión inmunohistoquímica de SP en epicardio Epicardio (20x) caso6

3.2. SISTEMA DE CONDUCCIÓN

Adulto

De forma general podemos decir que la SP presenta una expresión fundamentalmente nuclear en el **tejido de conducción** adulto.

Los miocitos del **sistema de conducción del corazón adulto** presentan una intensa expresión de SP en la totalidad de las células observadas, tanto a nivel del nódulo sinusal como del nódulo auriculoventricular. Más de un 70% presentan una expresión intensa de SP a nivel nuclear (+++), por lo que la puntuación de Allred es alta. A nivel citoplasmático encontramos expresión de la SP en todas las células del miocardio con una intensidad menor a la nuclear (+/++).

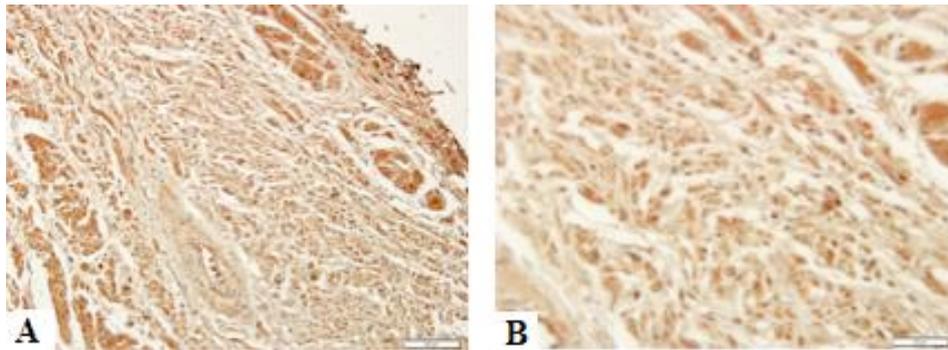


Figura 80. Expresión inmunohistoquímica de SP en células nodales. A) Nodo sinoauricular de adulto (4x). B) Nodo sinoauricular adulto (40x), se aprecia la expresión inmunohistoquímica de SP con un patrón nuclear.

Neonato

En las células del tejido de conducción del neonato se ha observado expresión de SP positiva a nivel citoplasmático. Sin embargo la tinción es negativa en los núcleos de los miocitos de conducción.

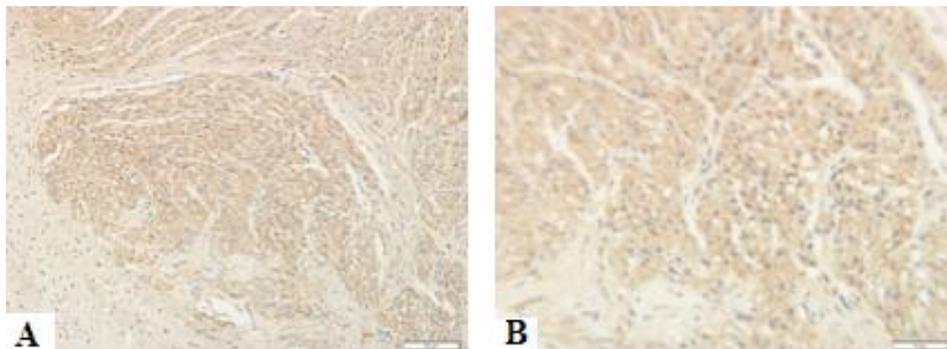


Figura 81. Expresión inmunohistoquímica de SP en miocitos del Nodo AV de neonato. A) Sección histológica del nodo AV de neonato (20X) y B) a 40X. Se aprecia la ausencia de expresión de SP nuclear.

3.3. ARTERIAS CORONARIAS

Las **células endoteliales** de las arterias coronarias de adultos expresan SP con una intensidad moderada alta a nivel nuclear. También el citoplasma expresa SP pero con una intensidad menor. Las **células musculares** de la capa media también tienen un patrón inmunohistoquímico positivo con predominio nuclear.

En los neonatos y en los fetos tal y como hemos visto en otras estructuras cardiacas, el patrón de expresión de la SP es fundamentalmente citoplasmático. Las células endoteliales son las únicas que tienen una valoración de tinción citoplasmática moderada-alta según el método de Allred. Ni los núcleos de las células endoteliales ni el resto de células que constituyen las coronarias de fetos y neonatos expresan SP.

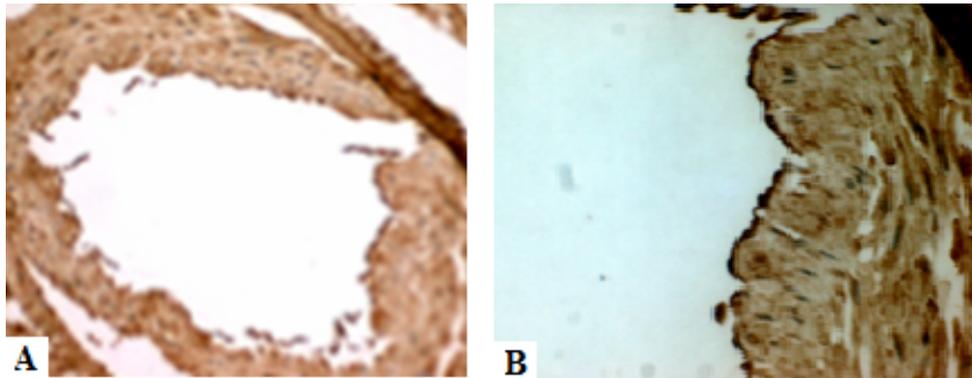


Figura 82: Expresión inmunohistoquímica de SP en en arteria coronaria de adulto. A) Arteria coronaria (10x), imagen reconstruída. B) Pared de arteria coronaria (40x). Nótese la intensidad mayor a nivel de las células endoteliales.

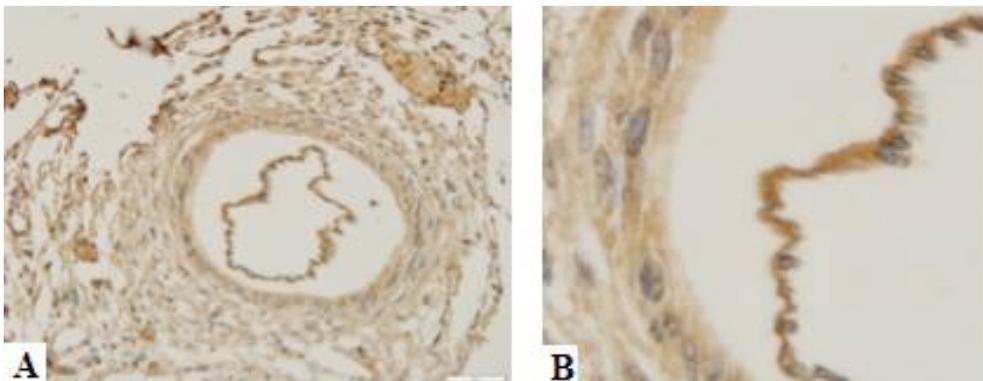


Figura 83. Expresión inmunohistoquímica de SP en en arteria coronaria de feto de 23 semanas. A) Arteria coronaria (40x), B)Detalle de A donde se aprecia el endotelio desprendido y la expresión nuclear negativa.

3.4. APARATO VALVULAR

La inmunoexpresión de SP en el tejido valvular ha sido constante en todas las muestras analizadas, tanto de fetos, neonatos como adultos. Entre todas las células que conforman las valvas tan solo existió expresión intensa de SP a nivel de la capa de endocardio que recubre tanto la cara auricular como la cara ventricular.

No encontramos expresión de SP en el núcleo de las células del tejido conjuntivo que compone el resto del tejido valvular cardiaco.

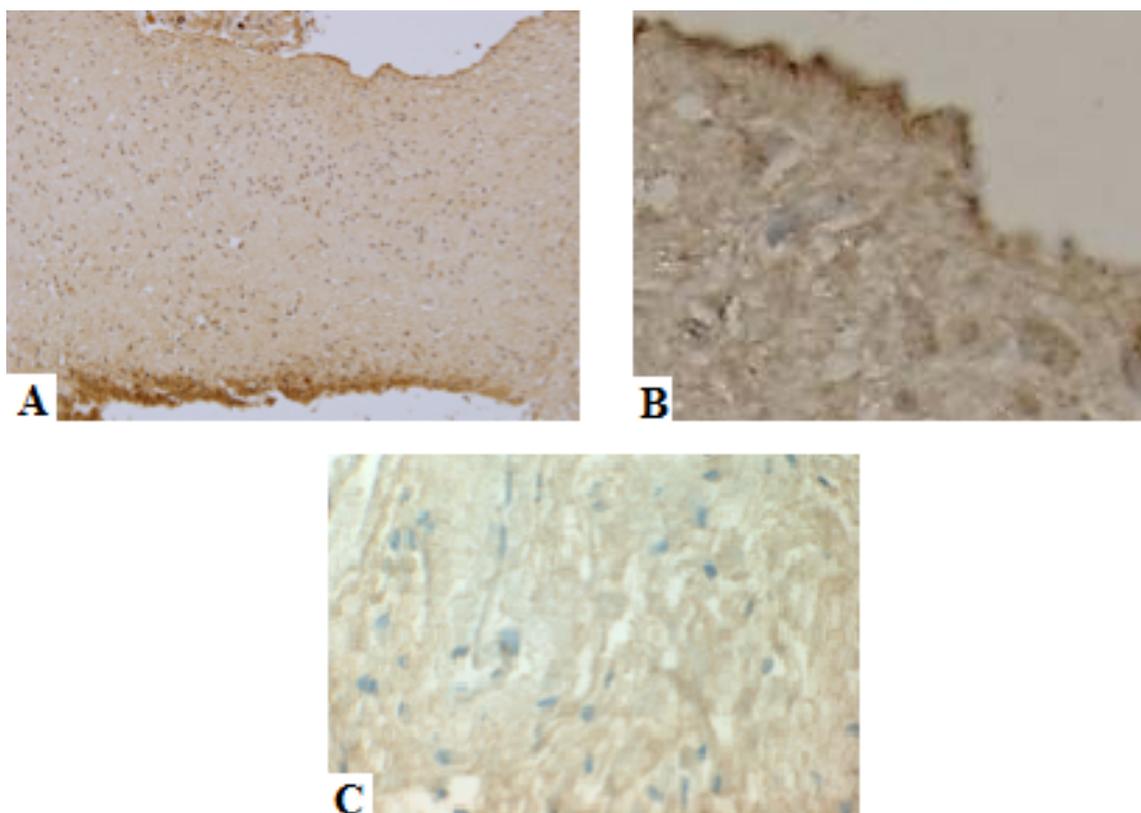


Figura 84. Expresión inmunohistoquímica de SP en en tejido valvular mitral. A) Corte a través de una valva mitral perteneciente a neonato de 34 semanas (20X) . B) Detalle de imagen A mostrándose la cara endocárdica de la válvula a mayor aumento. C) Sección de valva mitral de adulto (40X) (B).

3.5. GRANDES VASOS

El endotelio de las arterias elásticas, aorta y pulmonar, presentan una expresión positiva de SP, más intensa a nivel nuclear en el adulto. El resto de estratos de estas grandes arterias presentan una puntuación de Allred menor a 2, observándose tal y como vemos en la imagen, que el tejido conjuntivo no expresa SP y tan solo el citoplasma de algunas fibras musculares lisas de la capa media expresan débilmente SP.

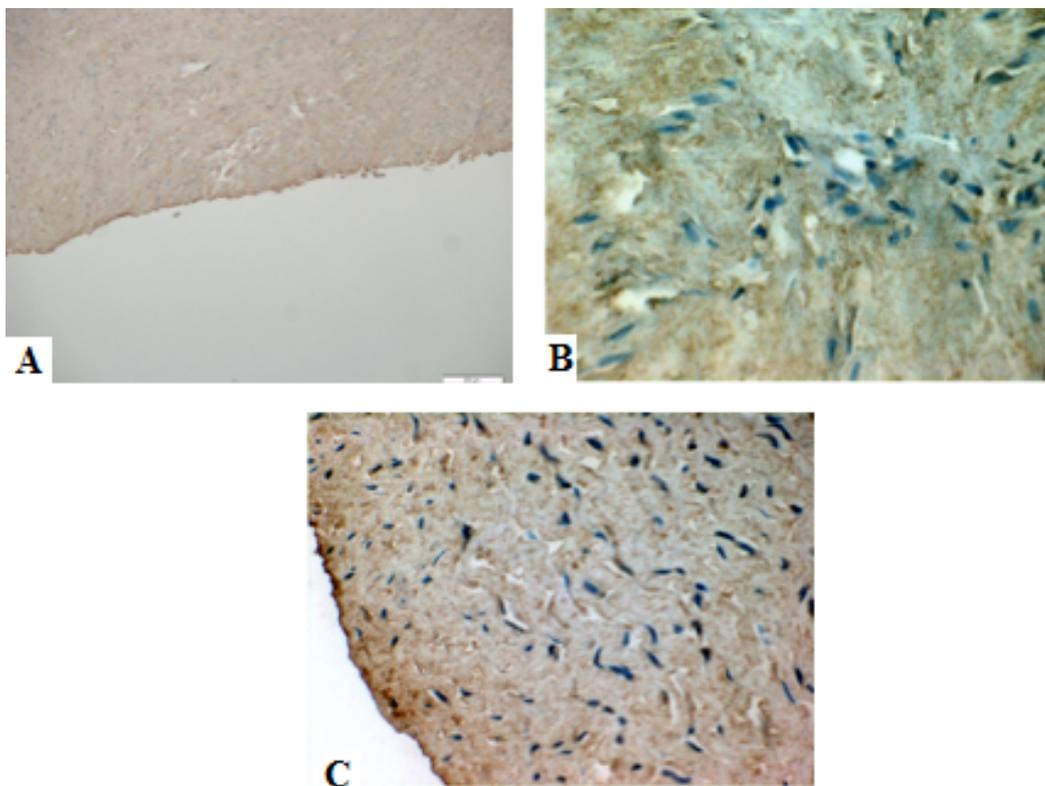


Figura 85. Expresión inmunohistoquímica de SP en la pared de la arteria aorta. A) Corte transversal, Corte de adulto (10X). B)(40x) 55 años C) Neonato (40x)

4. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR NK1 EN EL CORAZÓN

De forma general podemos decir que la expresión de NK1R en corazón tanto de adultos como de neonatos y fetos es menos intensa que la de la SP y, a diferencia de ésta, no se expresa de manera **intensa en los núcleos siguiendo un patrón más citoplasmático.**

4.1. PAREDES DEL CORAZÓN

Tanto el miocardio auricular como ventricular de fetos, neonatos y adultos presentan un patrón de expresión inmunohistoquímica del NK1R similar. Se ha observado que el miocardio cardiaco muestra una expresión de NK1R citoplasmática con valoraciones de tinción altas, mientras que la tinción es débil a nivel nuclear. La única distinción remarcable es la intensidad de la tinción, que en los cortes fetales es cuantitativamente más intensa. La única excepción a este patrón la hemos observado en el ventrículo derecho fetal donde algunos núcleos expresaban NK1R a nivel de la membrana nuclear (Figura 87-A).

4.1.1. Miocardio de aurícula derecha

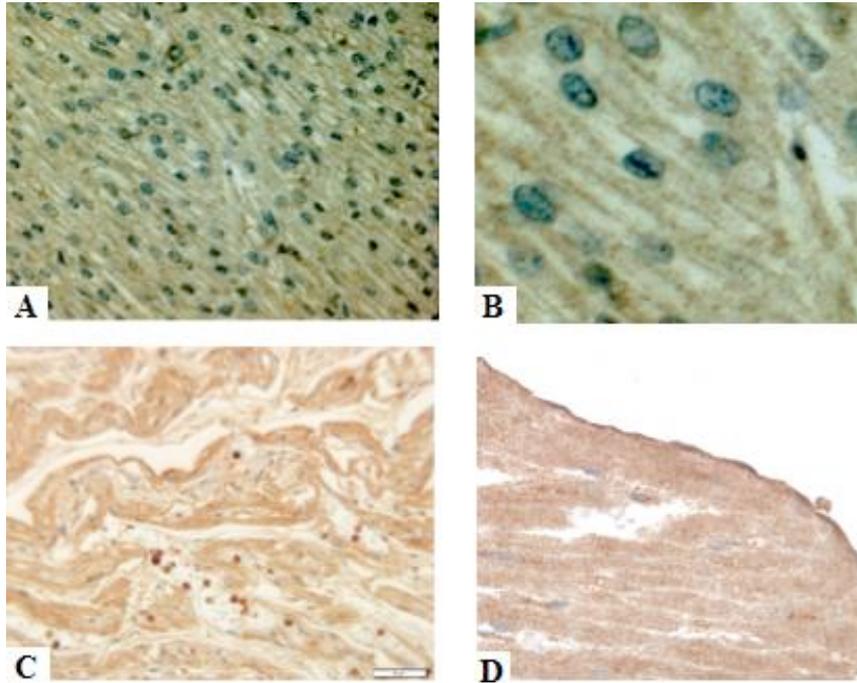


Figura 86: Inmunorreactividad de NK1R en miocardio de la aurícula derecha. Patrón citoplasmático.

A) Feto de 25 semanas (40X). B) Detalle de imagen A donde se aprecian los núcleos con tinción negativa. C) Neonato (40x). D) Adulto (40X)

4.1.2. Miocardio de ventrículo derecho

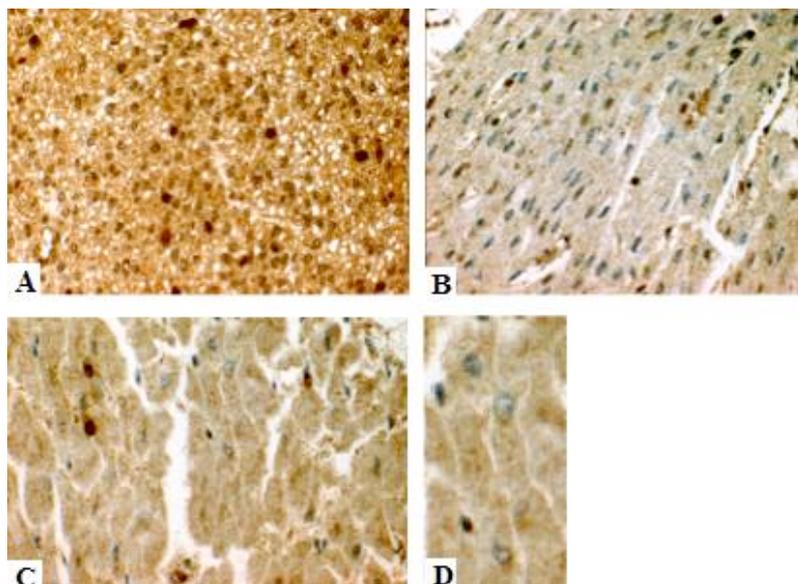


Figura 87. Expresión inmunohistoquímica de NK1R en el ventrículo derecho. A) Feto de 25 semanas (40X). B) Neonato de 34 semanas (40x). C) Adulto (40X). D) Detalle de la imagen precedente donde se aprecia la ausencia de inmunoespresión a nivel del núcleo del cardiomiocito.

4.1.3. Miocardio de aurícula y ventrículo izquierdo

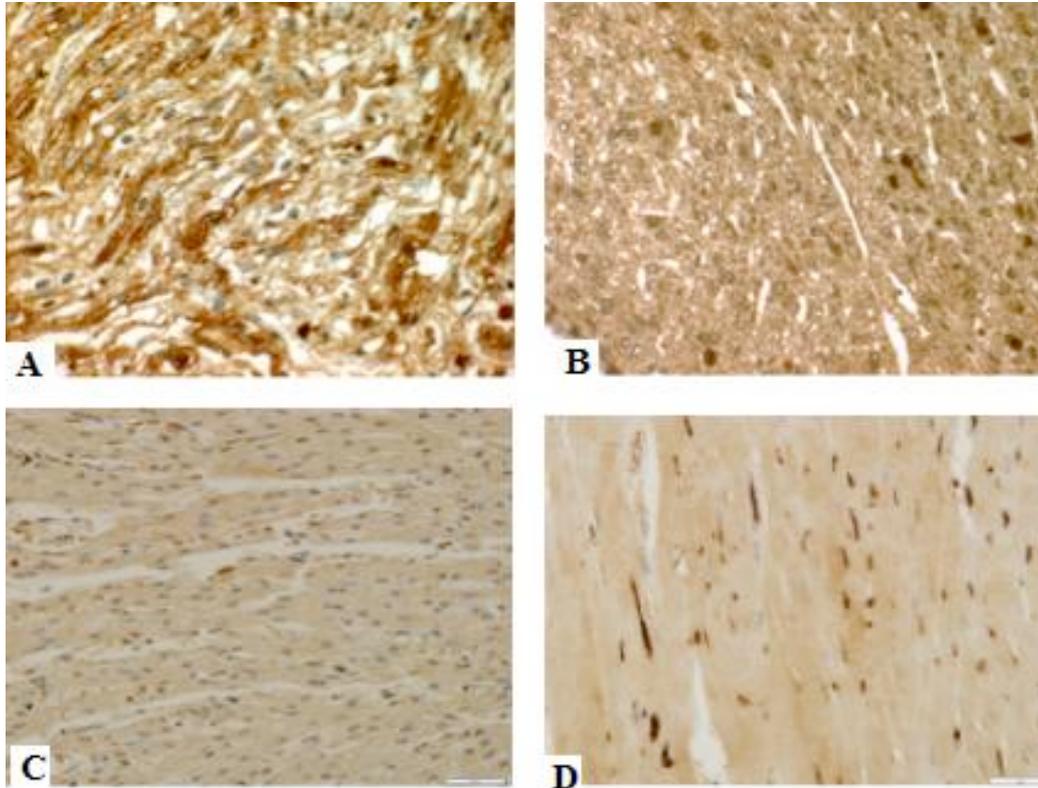


Figura 88. Expresión inmunohistoquímica de NK1R en aurícula y ventrículo izquierdo. A) Corte sagital de cardiomiocitos de la aurícula izquierda de neonato que muestra el patrón citoplasmático del NK1R. B) Cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de feto de 25 sem (40X). C) Cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de neonato (40X). D) Cardiomiocito de ventrículo izquierdo de adulto. Nótese que las estructuras que se aprecian con una mayor intensidad no corresponden a los núcleos de los cardiomiocitos sino a capilares y células intersticiales,

4.2. SISTEMA DE CONDUCCIÓN

De forma general podemos decir que el NK1R presenta una expresión citoplasmática en el tejido de conducción.

Los miocitos especializados del **sistema de conducción del corazón adulto** presentan una intensa expresión de NK1R en la totalidad de las células observadas, tanto a nivel del nódulo sinusal como del nodo auriculoventricular. La expresión es constante e intensa a nivel citoplasmático (puntuación de Allred: 8). De forma

aislada observamos que algunos núcleos también expresan NK1R, fundamentalmente a nivel de la membrana nuclear, pero el porcentaje de células con inmunoexpresión positiva nuclear es menor del 15%.

En neonatos el miocardio de conducción presenta un patrón de inmunorreactividad citoplasmático (puntuación de Allred a nivel citoplasmático: 6-7) sin que hayamos observado expresión de NK1R en el interior nuclear (puntuación de Allred a nivel nuclear: 0)

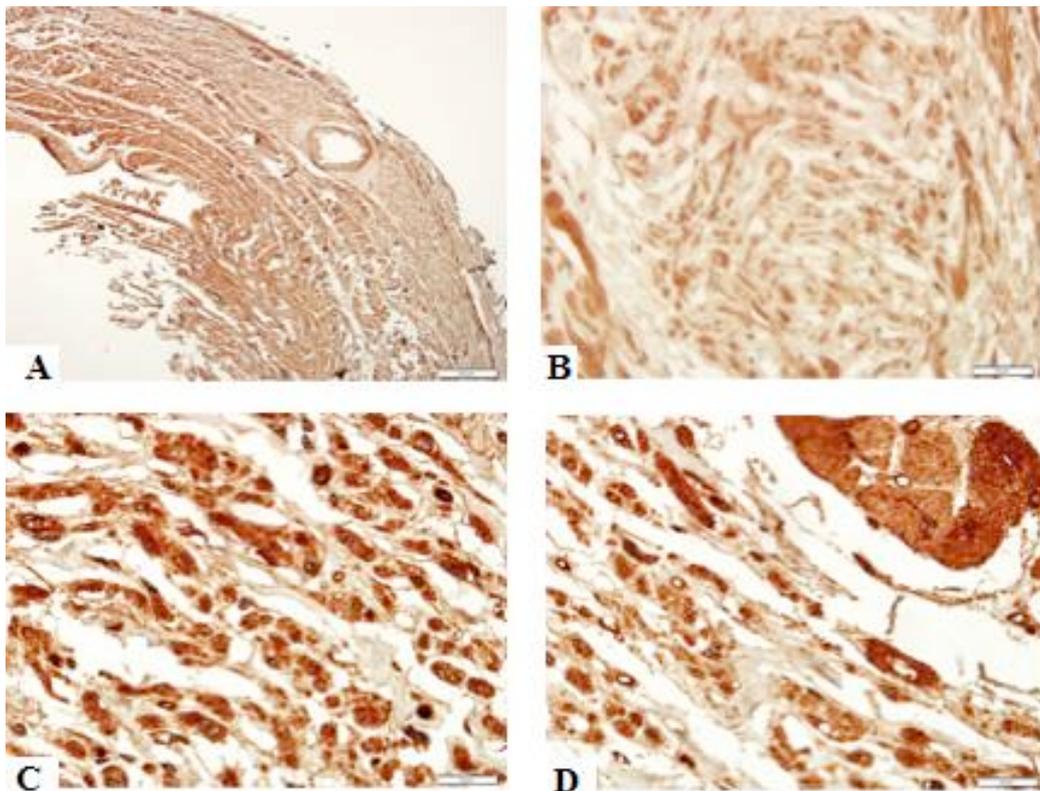


Figura 89. Expresión inmunohistoquímica de NK1R en miocitos del nodo sinoauricular de un corazón adulto. A) (4X). B) (40X). C) (100X). D) (100X) (esta última imagen se ve el miocito normal de trabajo y abajo los miocitos de conducción mas pequeños e irregulares)

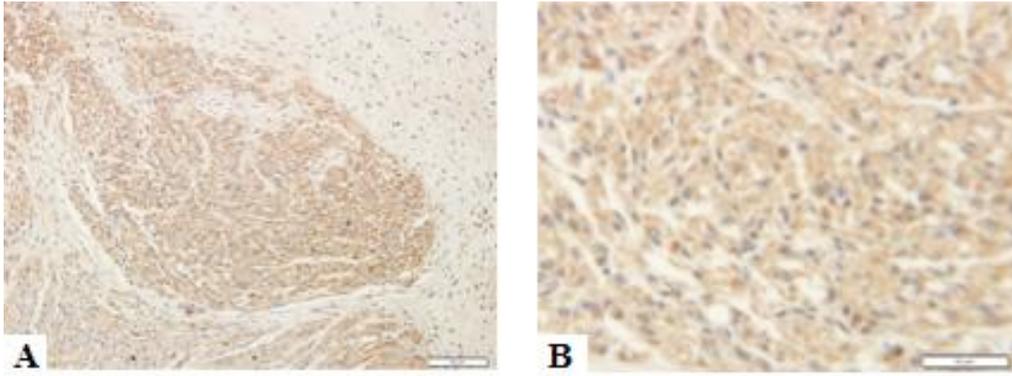


Figura 90. Expresión inmunohistoquímica de NK1R en miocitos del nodo auriculo ventricular de un corazón de neonato. A) (20X). B) (40X).

4.3. ARTERIAS CORONARIAS

Las arterias coronarias expresan NK1R en el **endotelio** de manera constante.

En adultos, el endotelio expresa NK1R en el 100% de las células con una intensidad alta. Algunos núcleos de las células endoteliales también expresan NK1R pero en una proporción variable (puntuación Allred a nivel nuclear de 6) . Las **células musculares** que conforman la túnica media también expresan NK1R, predominantemente a nivel citoplasmático.

En fetos y neonatos, al igual que ocurre en adultos, la expresión de NK1R es constante e intensa a nivel citoplasmático. Los núcleos de las células endoteliales de fetos y neonatos también expresan NK1R pero con una intensidad, proporcionalmente menos intensa que la observada en el adulto. Respecto al tejido conjuntivo que rodea a los vasos, no existe expresión inmunohistoquímica de NK1R ni nuclear ni citoplasmática en ninguna de las muestras estudiadas (Imagen C, Figura 91)

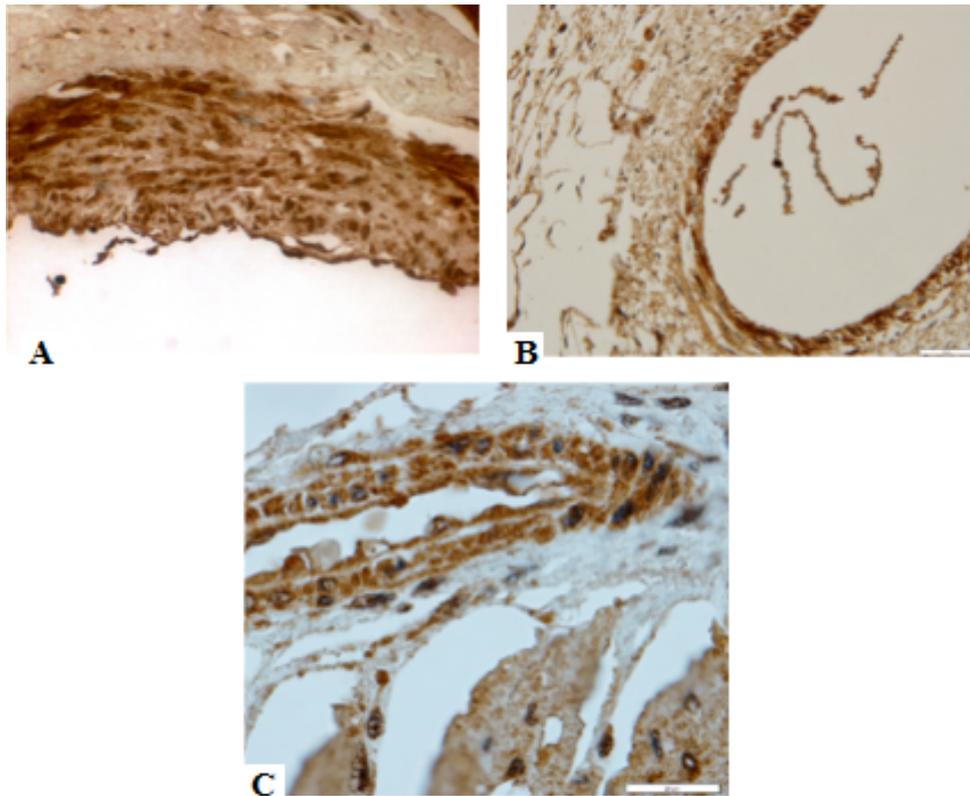


Figura 91. Expresión inmunohistoquímica de NK1R en arterias coronarias. A) Pared de arteria de corazón adulto (40X). B) Feto de 23 sem (40X), con endotelio desprendido en la luz del vaso. C) Recién nacido de 38 semanas (100X): obsérvese la ausencia de expresión inmunohistoquímica a nivel del tejido conjuntivo.

4.4. APARATO VALVULAR

La inmunoexpresión de NK1R en el tejido valvular ha sido constante en todas las muestras analizadas, tanto de fetos, neonatos como adultos. La mayor parte de las células que conforman las valvas expresan NK1R a nivel exclusivamente citoplasmático con una intensidad leve. Solo a nivel de las capas endocárdicas, que recubren tanto la cara auricular como la ventricular de la valva mitral, existe una tinción positiva para los núcleos y citoplasma y además con una intensidad moderada-alta.

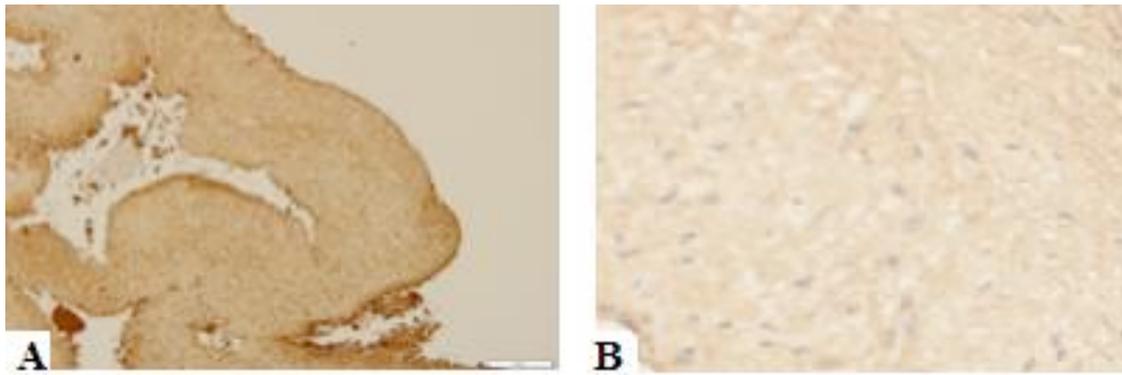


Figura 92. Expresión inmunohistoquímica de NK1R en valva mitral de neonato. A) Imagen a 40X. B) Detalle de imagen A.

4.5. GRANDES VASOS

El endotelio de las arterias elásticas, aorta y pulmonar, presentan una expresión positiva de NK1R, a nivel citoplasmático y nuclear. También el citoplasma de las fibras musculares que componen la capa media expresan NK1R con una intensidad leve. Por el contrario, el tejido conjuntivo no expresa NK1R ni a nivel nuclear ni citoplasmático como vemos en la imagen.

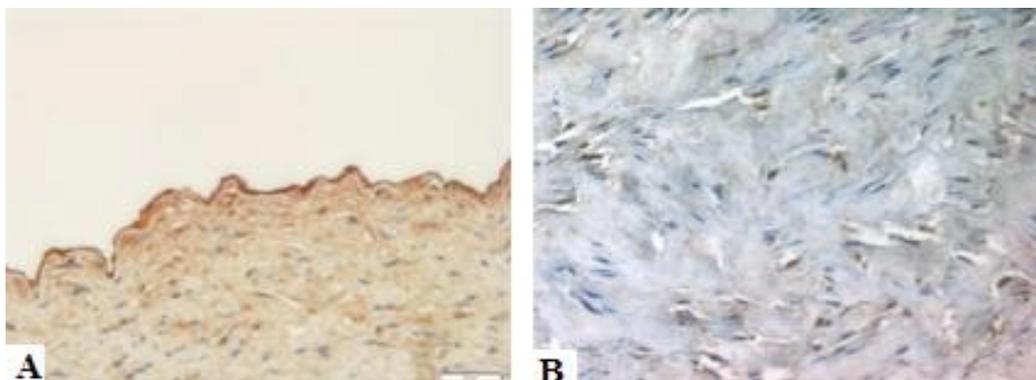


Figura 93: Inmunorreactividad a NK1R pared aortica. A) RNT(40x) B) Adulto (20X)

5. CONTROL NEGATIVO

Las Figura 94 muestra imágenes de los controles negativos (muestras en las que no se ha añadido el anticuerpo primario) realizados como control de calidad de la técnica y especificidad de los anticuerpos en las muestras de tejido cardiaco

utilizadas para este trabajo.

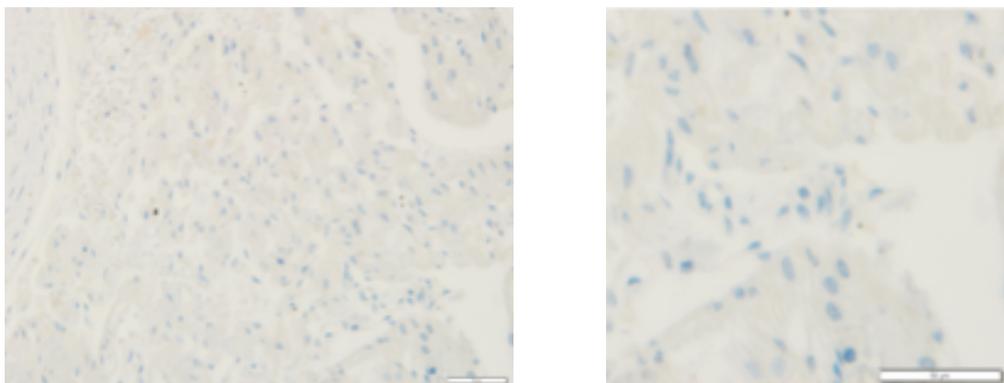


Figura 94: Control negativo.

5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

		SUSTANCIA P			NK1R		
		ADULTO	RN	FETO	ADULTO	RN	FETO
MIOCARDIO							
Aurícula derecha	CITOPLASMA	6.5	6.5	6.5	6	6-7	8
	NÚCLEO	8	2-3	2-3	4	< 2	< 2
Aurícula izquierda	CITOPLASMA	6.5	6.5	6.5	6	6	7
	NÚCLEO	6-7	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Ventrículo derecho	CITOPLASMA	6	6	7	6	6	7
	NÚCLEO	4-5	< 2	< 2	2-3	< 2	< 2
Ventrículo izquierdo	CITOPLASMA	5	5	7	6	6	6
	NÚCLEO	2-3	< 2	< 2	2-3	< 2	< 2
EPICARDIO							
Célula mesotelial	CITOPLASMA	6-7	6-7	6-7	6	6	6
	NÚCLEO	8	8	8	7	7	7
Tejido conjuntivo	CITOPLASMA	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	NÚCLEO	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
MIOCITOS DE CONDUCCIÓN							
	CITOPLASMA	6	5	-	8	6-7	-
	NÚCLEO	8	< 2	-	4-5	< 2	-
ARTERIA CORONARIA							
Endotelio	CITOPLASMA	6	6	6	7-8	7-8	7-8
	NÚCLEO	8	< 2	< 2	6-7	< 2	< 2
Célula muscular	CITOPLASMA	6	6	6	7-8	5-6	5-6
	NÚCLEO	8	< 2	< 2	4-5	< 2	< 2
TEJIDO VALVULAR							
Capa endocárdica	CITOPLASMA	6	6	6	6	7	7
	NÚCLEO	7-8	7	7-8	7	7	4
Tejido conjuntivo	CITOPLASMA	2-3	3	3	4	4	4
	NÚCLEO	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
GRANDES VASOS							
Endotelio	CITOPLASMA	6	6	6	6-7	6-7	6-7
	NÚCLEO	8	6-7	6-7	4	4	4
Capa muscular	CITOPLASMA	6	6	6	6	6	6
	NÚCLEO	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Tejido conjuntivo	CITOPLASMA	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	NÚCLEO	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

Tabla 10: Tabla resumen de la valoración inmunohistoquímica realizada en las muestras cardiacas tanto de adulto, recién nacidos (RN) y fetos. Se empleó la escala semicuantitativa de Allred para definir el grado de extensión (0: 0%, 1: <1%, 2: 1-10%, 3: 11-33%, 4: 34-66%, 5: >67%) e intensidad (0: nula, 1: débil, 2: intermedia, 3: fuerte.) De la suma de ambos parámetros se obtiene una puntuación final en un rango que oscila entre 0 y 8.

v. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1. Consideraciones generales

La presente tesis analiza aspectos novedosos sobre la SP y el NK1R el corazón, en particular en lo que respecta a su localización y distribución en este órgano.

Indudablemente sabemos que desde hace varias décadas se vienen desarrollando numerosos estudios referentes a este péptido que aportan datos innovadores y que plantean la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas. Sin embargo, aún no está establecido el papel exacto que desempeña la SP y el NK1R ni los mecanismos precisos que subyacen a las acciones que se les atribuyen.

Por este motivo, para continuar avanzando con éxito en el nuevo camino es fundamental tener establecidas unas bases que permitan construir sólidamente el que será un auténtico paradigma en la terapia farmacológica. En este sentido, resulta primordial conocer la localización exacta de la SP y el NK1R en el organismo libre de patología y en concreto, por ser el tema de nuestra investigación, en el corazón.

En la literatura médica, tal y como veremos más adelante, se han utilizado una enorme disparidad de clasificaciones en función de la estirpe animal estudiada y del enfoque parcial de cada investigación. No existe unanimidad en las referencias bibliográficas que describen la localización de la SP y el NK1R en el corazón. Además todos los trabajos se atienen a delimitar este neuropéptido al sistema nervioso y se centran sobre todo en describir los efectos que produce la SP en cada uno de los tejidos que se estudian. Todo esto está suponiendo una dificultad a la hora de seguir avanzando puesto que si no existen unos valores claros de referencia en ausencia de enfermedad es imposible comparar e inferir correctamente los resultados y las evidencias descritas objetivadas.

Nuestro estudio describe el patrón de expresión de la SP y el NK1R en tejido cardiaco humano fetal, neonatal y adulto libre de cualquier patología cardiaca o sistémica que pudiera interferir con lo que entendemos es un patrón de

normalidad o expresión basal. No existe o al menos nosotros no tenemos constancia de que exista ningún trabajo publicado hasta el momento actual que estudie la distribución de este péptido en el corazón humano adulto, de fetos o neonatos. Además, por primera vez se evidencia la presencia de SP y NK1R en las propias células del músculo cardiaco, algo que nunca antes había sido demostrado ni en humanos ni en ninguna otra especie animal.

2. Perfil de la población estudiada y metodología de nuestro estudio.

Se trata de un estudio morfológico, descriptivo y retrospectivo en el que evaluamos de forma semicuantitativa la expresión inmunohistoquímica de la SP y NK1R en el corazón. Las muestras que hemos querido seleccionar para la realización de este trabajo corresponden a tejido cardiaco humano fetal, neonatal y adulto. La elección del ser humano como especie para este estudio morfológico se basó en nuestra condición de médicos, en la ausencia de estudios previos similares y en la variedad de los resultados publicados según la especie animal estudiada. Todas las muestras se obtuvieron del depósito de material histológico del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla contando para ello con la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica y el Biobanco de dicho centro. Se revisaron todas las autopsias realizadas en este centro durante el año 2012 computándose un total de 117 autopsias. De las muestras de autopsias totales (117) se excluyeron aquellas que no cumplieran los criterios de inclusión con el fin de obtener una población de estudio seleccionada que evitara posibles factores de confusión que pudieran artefactar o falsear los resultados obtenidos. De esta manera, los casos elegibles o que pudieran ser incluidos en la investigación se redujeron a 33. Por último, de estos 33 se seleccionó una muestra representativa constituida por 10 autopsias que componen nuestra muestra de estudio final. Para asegurar la representatividad de la misma, se seleccionó las autopsias a través de un muestreo aleatorio simple. No existe como vemos, cálculo previo del tamaño muestral porque al tratarse de un estudio descriptivo y al realizar una técnica de muestreo

de forma probabilística queda asegurada la representatividad de la muestra. Por tanto, los resultados obtenidos pueden inferirse a las 33 piezas anatómicas.

Durante el procesamiento de las muestras se realizaron los pertinentes controles de calidad (preabsorción, control negativo y control positivo) para demostrar la objetividad de la técnica inmunohistoquímica empleada. Además, en todos los casos observamos que el patrón de inmunorreactividad tanto de la SP como del NK1R se circunscribe y coincide con estructuras anatómicas e histológicas, a diferencia de lo que ocurría con los artefactos. Todo esto nos sirve como validación para poder afirmar que los resultados obtenidos de la expresión inmunohistoquímica reflejan la existencia real en dichos tejidos tanto de la SP como del NK1R.

Para la valoración e interpretación de los resultados se empleó un sistema ciego que garantizara que en el momento de visualizar las diferentes muestras al microscopio no se conociera ninguna característica del sujeto del que procedían, con el fin de objetivar dicha interpretación y evitar cualquier sesgo derivado de un condicionamiento subjetivo previo por parte del observador. Además, el empleo de una escala semicuantitativa para la valoración de la extensión e intensidad de la inmunorreactividad permitió homogeneizar y objetivar en mayor medida los resultados obtenidos entre los diferentes casos de estudio.

La inclusión de autopsias de corazones de diversos estadios la consideramos de gran interés al permitirnos establecer si el patrón de expresión que observamos en sujetos adultos está presente ya en el nacimiento o, por el contrario, éste se modifica a lo largo de la vida de cada sujeto.

3. Discusión del estudio morfológico de la SP y el NK1 R en el corazón

Los resultados de nuestro estudio evidencian el patrón de expresión específico de la SP y el NK1R en corazones humanos. Los hallazgos descritos demuestran la existencia de una expresión inmunohistoquímica, tanto de SP como de su receptor NK1, en todas células de las diferentes estructuras histológicas y

funcionales del corazón de fetos, neonatos y adultos, atendiendo a un patrón que se repite de manera constante.

Las células cardiacas son células muy especializadas que se agrupan en tejidos de diferente estirpe. Cada una tiene un papel específico en la función cardiaca y en el control de las distintas variables cardiovasculares. Además, en la regulación de la actividad cardiaca intervienen numerosas sustancias (neurotransmisores, neuromoduladores, péptidos como por ejemplo la SP...) que han sido identificadas, algunas muy recientemente, en el corazón

Este estudio se ha centrado en describir la distribución morfológica de SP y NK1R en tejido cardiaco humano. Los hallazgos encontrados los comentamos a continuación siguiendo el mismo orden utilizado en la exposición de los resultados:

PARED CARDIACA

Miocardio

Hemos observado que las células musculares cardiacas expresan SP y NK1R de una manera constante pero con un patrón y una intensidad variable según la localización y la madurez de la pieza cardiaca estudiada.

En fetos y neonatos el patrón de expresión inmunohistoquímica para la SP y NK1R es citoplasmático. La expresión de SP y NK1R a nivel nuclear es negativa o débilmente positiva. Este patrón citoplasmático en fetos y neonatos se repite de forma constante en AD, AI, VD y VI. Además es importante remarcar que la intensidad de la tinción inmunohistoquímica citoplasmática observada en los cortes fetales es siempre mayor que la observada en neonatos y adultos.

El miocardio adulto presenta una mayor heterogenicidad en cuanto a la expresión de SP y NK1R. La AD es la región de mayor inmunoeexpresión de SP y NK1R, tanto a nivel nuclear (puntuación de Allred de 8) como citoplasmático. También el miocardio de la aurícula izquierda presenta un patrón inmunohistoquímico nuclear aunque las puntuaciones de Allred observadas a este nivel son inferiores a las de la aurícula derecha. A nivel ventricular, la proporción de núcleos de cardiomiocitos que expresan SP y NK1R es baja con respecto a la observada en las

aurículas. Aunque sí observemos en los cortes ventriculares inmunoexpresión fuertemente positiva para SP y NK1R, las estructuras con tinciones positivas corresponden no a miocardio ventricular sino a tejido intersticial, fundamentalmente capilares, nervios y vasos que irrigan la masa miocárdica.

Epicardio

Los resultados de nuestro trabajo demuestran una intensa inmunoexpresión de SP a nivel de la capa de células mesoteliales que conforman el epicardio tanto de adultos, fetos y neonatos. Esta expresión positiva se localiza a nivel tanto nuclear como citoplasmático. Respecto al receptor NK1R también hemos encontrado una expresión inmunohistoquímica positiva con intensidad alta y con el mismo patrón de distribución.

TEJIDO DE CONDUCCIÓN

Los miocitos adultos del sistema de conducción expresan de forma constante y con una intensidad siempre alta SP y NK1R. El patrón de expresión es más intenso a nivel nuclear aunque el 100% de las células tiñen el citoplasma con una intensidad también alta. En fetos y neonatos, sin embargo, el patrón de expresión de la SP Y NK1R es citoplasmático sin existir tinción positiva en la mayor parte de los núcleos.

ARTERIAS CORONARIAS

Las células endoteliales de las arterias coronarias de adultos expresan SP y NK1R con una intensidad moderada alta a nivel nuclear y también a nivel citoplasmático pero con una intensidad ligeramente menor. Las células musculares de la capa media también tienen un patrón inmunohistoquímico positivo con predominio nuclear.

En los neonatos y en los fetos tal y como hemos visto en otras estructuras cardiacas, el patrón de expresión de la SP es fundamentalmente citoplasmático. Ni los núcleos de las células endoteliales ni el resto de células que constituyen las coronarias de fetos y neonatos expresan SP de forma importante.

TEJIDO VALVULAR

Con el objetivo de simplificar el estudio y minimizar errores, el tejido valvular fue analizado siempre a nivel de la valva mitral.

Entre todas las células que conforman las valvas tan solo existió expresión de SP y NK1R a nivel de la capa de endocardio que recubre tanto la cara auricular como la cara ventricular valvular. La inmunoexpresión fue más intensa a nivel nuclear tanto en fetos, neonatos como adultos.

En el tejido conjuntivo que compone el resto del tejido valvular cardiaco la expresión inmunohistoquímica de SP y NK1R fue débil y predominantemente citoplasmática.

GRANDES VASOS (AORTA Y PULMONAR)

La capa de la pared de estos grandes vasos que expresa SP y NK1R con mayor intensidad es la capa íntima, concretamente a nivel del endotelio vascular. Tanto el citoplasma como el núcleo de estas células expresan SP y NK1R siendo más intenso a nivel nuclear. Del resto de estratos, tan solo el citoplasma de algunas fibras musculares lisas de la capa media expresan débilmente SP y NK1R. El tejido conjuntivo que rodea los vasos presenta una reacción inmunohistoquímica negativa.

Hemos demostrado, por tanto, la expresión tanto de SP como NK1R en corazones humanos sanos.

Los hallazgos descritos en este trabajo demuestran la existencia de una expresión inmunohistoquímica tanto de SP como de su receptor NK1 en la mayoría de las células de las diferentes estructuras histológicas y funcionales del corazón de adulto y neonato, atendiendo a un patrón que se repite de manera constante. Por tanto, estos datos ponen de manifiesto que existe SP y NK1R en todas las estructuras cardiacas analizadas y en casi todos los tipos celulares.

4. Comparación con otros autores y confrontación con nuestros resultados.

La SP, péptido endógeno perteneciente a la familia de las taquicinas, ha sido clasificada desde su descubrimiento en 1970 como un neurotransmisor. De ahí que desde entonces se haya considerado que la presencia de este péptido en tejidos periféricos (corazón, pulmón, intestino, piel...) sea debido a su liberación desde terminales nerviosas

En el corazón, a la SP se le han atribuido diversas acciones. Tiene efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos (Hoover 1990), (Hoover, Chang et al. 2000). Produce una intensa vasodilatación en las arterias coronarias y en el resto de vasos sanguíneos al unirse a su receptor NK1R, en el endotelio vascular (Stewart-Lee and Burnstock 1989). Tiene un papel fundamental en la miocarditis vírica y en otras miocardiopatías estimulando la producción de citoquinas inflamatorias y contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad (Robinson, Garza et al. 2009), (Wang, Shimada et al. 2010), (Dvorakova, Kruzliak et al. 2014), (Robinson, Taffet et al. 2015). También se ha relacionado con la transmisión del dolor que produce la isquemia cardiaca, la claudicación intermitente o los aneurismas disecantes (Foreman, Garrett et al. 2015), (Amadesi, Reni et al. 2012). En los últimos años se está investigando la relación de la SP con el remodelamiento cardiaco post infarto y con la insuficiencia cardiaca y existen artículos que aseguran que desempeña una función esencial en estas situaciones patológicas (Dehlin and Levick 2014), (Ng, Sandhu et al. 2014), (Granger and Povsic 2014)

Pero para entender el verdadero papel que desempeña este péptido en el corazón, es fundamental conocer primero su localización. Algunos investigadores han descrito la distribución de la SP en este órgano, sin embargo, se aprecian demasiadas diferencias en los resultados de los diferentes estudios (Tabla 11). También existen grandes variaciones en función de la especie animal analizada. Por último, todos los trabajos realizados hasta la fecha actual que analizan la distribución de la SP en el corazón se centran en estudiar las fibras nerviosas

cardiacas considerando que es el sistema nervioso el responsable de su liberación en el corazón.

Reinecke fue el primero en identificar SP en las fibras nerviosas del corazón de mamíferos en el año 1980 (Reinecke, Weihe et al. 1980). Se trató de un estudio realizado en cobayas en el que se concluyó que las arterias coronarias de los corazones estudiados estaban inervadas por fibras que contenían SP. Hougland y Hoover, 3 años más tarde, observaron que estas fibras no solo se hallaban en el sistema arterial sino también en la pared auricular y ventricular así como en las válvulas auriculoventriculares (Hougland and Hoover 1983). Wharton et al aseguraron que existía una mayor densidad de fibras que contenían SP en la base del corazón y a nivel endocárdico, particularmente alrededor de las trabéculas y los músculos papilares de los ventrículos (Wharton, Polak et al. 1981). Sin embargo no hallaron diferencias entre el ventrículo izquierdo y el ventrículo derecho. Dalsgaard observó una mayor inervación de fibras que contenían SP en las aurículas y en torno a los vasos sanguíneos. Además cuantificó los niveles de SP en el corazón, demostrando que la concentración en la aurícula derecha era cuatro veces más alta que en el ventrículo izquierdo (Dalsgaard, Franco-Cereceda et al. 1986). Nuestros resultados corroboran esta tesis, pues nosotros hemos observado que la inmunoreactividad a SP es mayor en las aurículas que en los ventrículos con predominancia en la aurícula derecha. Papka y Urbano identificaron neuronas que contenían SP en el epicardio, las aurículas, las válvulas auriculoventriculares y en los ganglios cardiacos (Papka and Urban 1987). La mayor parte de todos estos estudios se han realizado en corazones de cobaya. Nostros hemos observado en humanos que la inmunoreactividad a SP se localiza en epicardio y en la válvula mitral que ha sido la válvula objeto de nuestro estudio.

En ratas, sin embargo, Hougland y Hoover no detectaron SP (Hougland and Hoover 1983). Otros autores como Papka y Urbano si observaron este péptido localizado a nivel del miocardio y epicardio auricular y ventricular aunque a concentraciones mucho más bajas que las encontradas en el corazón de cobaya (Papka and Urban 1987). Onuba et al estudiaron los corazones de tres ratas y observaron una mayor concentración de SP a nivel de la aurícula derecha y en torno a las arterias coronarias (Onuoha, Alpar et al. 1999). Respecto a otras

especies como por ejemplo el ratón, tan solo existen dos artículos publicados que describen la distribución de esta sustancia en el corazón, a pesar de ser una de las especies más utilizadas en los estudios de enfermedad cardiaca. El primer trabajo realizado en el año 2011 concluye que existen abundantes fibras nerviosas que contienen SP en el epicardio y en los ganglios nerviosos localizados en la base del corazón, aorta ascendente y tronco pulmonar (Rysevaite, Saburkina et al. 2011). El segundo, en el año 2014 localiza fibras nerviosas que contienen SP en el ganglio cardiaco intrínseco, región auricular y junto a los vasos sanguíneos (Li, Hatcher et al. 2014). Otros estudios realizados en esta especie concluyen que ante determinadas enfermedades cardiacas, como por ejemplo la miocarditis, se produce un aumento significativo de SP en el corazón (D'Souza, Garza et al. 2007), (Robinson, Garza et al. 2009), (Wang, Shimada et al. 2010). Sin embargo, al no existir un patrón de distribución basal en el corazón de ratón libre de enfermedad estos resultados no se pueden comparar con los resultados de otros estudios realizados en otras especies. Nosotros hemos observado que la inmunoreactividad a SP se localiza en el tejido de conducción cardiaco, en las aurículas y en los ventrículos.

Zhu y Dey estudiaron tres corazones de gato y observaron que las fibras que contenían SP se localizaban a nivel del endocardio y miocardio auricular y ventricular (Zhu and Dey 1992). En el perro, Brum y colaboradores analizaron los efectos de la sustancia p en las arterias coronarias (Brum, Go et al. 1986). En el corazón del mono (*Macaca fascicularis*) se identificaron dos tipos de fibras nerviosas que contenían SP, localizadas fundamentalmente alrededor de los vasos sanguíneos y entre las fibras musculares (Tay and Wong 1992). Nuestros hallazgos amplían el conocimiento sobre la distribución de la SP localizando en todas las estructuras y células cardiacas.

También existen algunos trabajos que directa o indirectamente, estudian la distribución de la SP en el corazón del hombre. Weihe et al observaron que todas las arteriolas, venas y capilares del corazón estaban inervadas por fibras nerviosas que contenían SP (Weihe, Reinecke et al. 1981). Algunos años más tarde se publicó la existencia de SP en la adventicia de las arterias coronarias ateroscleróticas (Laine, Naukkarinen et al. 2000). En el año 1990 Wharton y colaboradores

estudiaron la inervación del corazón trasplantado (Wharton, Polak et al. 1990). Observaron que existía una menor densidad de fibras nerviosas con SP que la descrita en otras especies animales y que fundamentalmente éstas se localizaban en los ganglios intrínsecos y en los troncos nerviosos cardiacos. También en un estudio publicado por Crick, Wharton y colaboradores sobre la inervación del sistema de conducción cardiaco se identifica SP en el sistema de conducción y se postula que podría tener un papel importante en la modulación neural del sistema de conducción (Crick, Wharton et al. 1994). Nuestros hallazgos estan de acuerdo con ellos y confirman la existencia de SP en el tejido de conducción cardiaca. Dado el carácter de neurotransmisor activador de la SP, probablemente la SP pueda esta regulando la hiperexcitabilidad cardiaca y los fenómenos de taquicardia que se producen en patologías tales como el dolor o la inflamación, ambos mediados por SP. Además nosotros hemos observado que el tejido de conducción cardiaco expresan NK1R con lo cual cualquier aumento de SP exógeno (sistémico) o endogeno (cardiaco) pueden estar relacionados con los fenómenos de taquiarritmias. Como es sabido, los antagonistas de los NK1R, concentración dependiente, pueden contrarrestar los efectos fisiopatologcos de la SP (Muñoz and Coveñas 2014). Esto significa que probablemente usando este tipo de compuestos puede ser posible actuar sobre estos fenómenos fisiopatologicos mediados por la SP, así probablemente los antagonistas de los NK1R puedan desempeñar un papel en el tratamiento de las taquiarritmias mediadas por SP. Hoover observó SP en el área del plexo ganglionar de la aurícula derecha en pacientes sometidos a cirugía de revascularización coronaria (Hoover, Isaacs et al. 2009). En otro estudio en el que enumera las acciones de las taquicininas sobre el corazón, afirma que las fibras que contienen SP se encuentran localizadas la zona del ganglio intrínseco cardiaco, en las arterias coronarias, en el área nodal y resto de tejido de conducción y en el tejido muscular cardiaco (Hoover, Chang et al. 2000).

ESPECIES	LOCALIZACIÓN
Cobaya	Vasos sanguíneos, aurículas, ventrículos (endocardio, miocardio, epicardio), válvulas, haz de His, ganglio intrínseco cardiaco.
Rata	Aurícula, ventrículo izquierdo (epicardio, miocardio), vasos sanguíneos
Ratón	Ganglio intrínseco cardiaco, haces nerviosos
Gato	Aurícula, endocardio
Perro	Arterias coronarias
Primate	Aurículas, miocardio, ganglio intrínseco, vasos.
Humano	Ganglio intrínseco, vasos sanguíneos, miocardio

Tabla 11: Resumen de los resultados de diferentes estudios en cuanto a la localización de la SP en el corazón de diversas especies. Miocardio hace referencia a las fibras nerviosas que recorren los cardiomiocitos y no significa que la SP esté dentro de los cardiomiocitos.

Origen no neural de la SP

Durante mucho tiempo se ha considerado que las fibras C eran las responsables principales de la producción de la SP. Pero han aparecido estudios que demuestran que otras fibras nerviosas contienen este neuropéptido (Dalsgaard, Franco-Cereceda et al. 1986), (Hua, Ricketts et al. 2004), (Hoover, Shepherd et al. 2008). Con ello se pone de manifiesto la complejidad de las redes neuronales asociadas al corazón. Por otra parte, la capsaicina causa una destrucción selectiva de las fibras C y sin embargo esto no se traduce en la desaparición de la SP de los corazones de ratas estudiados sino tan solo una disminución de su cantidad (Holzer, Bucsecs et al. 1982). Así se confirma que existen otras fuentes de SP. De hecho se ha demostrado que algunas células endoteliales de las arterias coronarias de corazones de rata contienen ellas mismas SP (Milner, Ralevic et al. 1989). También se ha observado que la SP se expresa en las plaquetas donde desempeña un papel proagregante (Jones, Tucker et al. 2008). Por tanto, a medida que se avanza en el estudio de las diversas taquicinas y se

conocen los efectos de la SP, van apareciendo nuevas hipótesis y conclusiones en relación al origen de esta sustancia y su implicación en diversas patologías cardiacas. Nuestros resultados muestran que existe SP en todas las células del corazón (tanto a nivel nuclear como citoplasmático), con una concentración diferente dependiendo del tipo de célula y de su localización. Podría existir un mecanismo autocrino, paracrino y endocrino regulador a nivel cardiaco, que a su vez interacciona con el sistema nervioso que inerva el corazón. Se trataría de un verdadero cross-talk entre las células cardiacas y las células nerviosas (Sistema Nervioso Central). Esta interacción sería bidireccional pues la SP se produce tanto en el SNC como en el corazón. De manera similar ha sido publicado esta interrelación entre las células tumorales y el SNC (Muñoz et al. 2015).

Receptores taquicinérgicos en el corazón

Muchas células cardiacas son capaces de responder a la SP que es liberada en el corazón sin embargo no existe unanimidad en los resultados de los trabajos que estudian la localización de los receptores taquicinérgicos en el corazón. Thompson y colaboradores determinaron los subtipos de receptores taquicinérgicos en las neuronas cardiacas intrínsecas de corazones de perros (Thompson, Hoover et al. 1998). Un agonista selectivo del NK1R redujo la actividad de las neuronas en la aurícula derecha en algunos animales mientras que aumentó la actividad en otros. Agonistas selectivos del NK2R disminuyeron la actividad neuronal de la aurícula derecha mientras que la estimulación de los NK3R la aumentó. Hoover y Hancock describieron los receptores de la SP en los ganglios parasimpáticos en el tejido conectivo adyacente al tronco pulmonar, aorta ascendente, aurícula derecha y arterias coronarias. No encontraron receptores en los ventrículos. (Hoover and Hancock 1988). Walsh et al localizaron receptores taquicinérgicos en la adventicia de los grandes vasos y arterias coronarias, así como en el tejido conectivo del corazón y en las valvas de las válvulas cardiacas. No observaron tampoco receptores en los cardiomiocitos. (Walsh, Weglicki et al. 1996). Sin embargo, con posterioridad se ha demostrado que los cardiomiocitos de ratas neonatales expresan genes para NK1R y NK3R (Church, Arkininstall et al. 1996). Chang y Hoover identificaron los subtipos específicos de receptores de

taquicininas en el corazón de cobayas y analizaron la respuesta de cada uno de ellos a la SP y NKA. Comprobaron la potente vasodilatación que produce la activación del NK1R y demostraron por vez primera que el NK2R median una respuesta vasoconstrictora de las arterias coronarias (Chang, Hoover et al. 2000). Nuestros hallazgos muestran que los NK1R se expresan a nivel cardiaco en todas las estructuras y en todos sus componentes celulares. Eso significa que es posible una regulación cardiaca (global y de cada una de sus células) a través de la SP y del NK1R, lo cual es determinante a la hora de comprender la fisiología y la fisiopatología cardiaca. Pero lo más interesante es su prometedor papel terapéutico, pues existen antagonistas de los NK1R que podrían bloquear los fenómenos fisiopatológicos mediados por SP/NK1R. Desde el punto de vista farmacológico, por tanto, se abre la puerta al posible uso de este tipo de fármacos en la patología cardiaca mediada por SP/NK1R

CONFRONTACIÓN

Después de analizar las publicaciones referentes a la SP y NK1R en el corazón es evidente la ausencia de unanimidad en la literatura científica así como el reducido número de trabajos realizados hasta la fecha actual. Esta gran disparidad en los resultados analizados unido a los muchos interrogantes que quedan por resolver constata la necesidad de un mayor esfuerzo para poder llegar a desentrañar las complejas acciones de la SP a través del NK1R en el corazón.

Por primera vez, nosotros hemos demostrado que tanto la SP como el NK1R se expresan en tejido cardiaco sano de fetos, neonatos y adultos humanos. A diferencia de todas las publicaciones que hemos citado, nuestros resultados demuestran que dicha expresión sigue un **patrón determinado que se repite de manera constante** en los diferentes casos estudiados y que **la presencia de la SP en el corazón no depende exclusivamente del sistema nervioso** sino que el resto de células cardiacas también la producen.

Por tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados podemos afirmar que además de la conocida fuente neuronal de la SP -secreción paracrina neuronal- otras células no neuronales pueden producirla. Su presencia en el corazón podría

ser fruto también de una secreción autocrina, secreción paracrina no neuronal y secreción endocrina cardiaca.

Prueba de esta producción autocrina es que ha sido descrita la expresión del gen Tac1 en un gran número de tejidos humanos como son el cerebro, el corazón, el bazo o la glándula mamaria (Maggi 1995, 1997; Pinto et al 2004). En la misma línea, se ha descrito que existe SP en la placenta, que es un órgano carente de inervación (Muñoz, Pavón et al. 2010).

La ubicua expresión del gen de la SP sugiere que serían las propias células las que, ante un estímulo determinado sintetizarían su propia SP para actuar sobre la misma célula productora –secreción autocrina- o también sobre células de la vecindad –secreción paracrina no neural- ejerciendo así la función requerida en respuesta a las demandas fisiológicas o vías metabólicas en la que participen.

Respecto a la secreción endocrina, sí se ha descrito en diversos trabajos como la SP y otras TK pueden ejercer su función en localizaciones diana alejadas del lugar de síntesis después de ser liberadas al torrente sanguíneo (Severini et al, 2002). Parte de esta secreción obedecería a una producción neuroendocrina. Es decir, las diferentes células nerviosas y no nerviosas del corazón que producen SP vierten dicho péptido a la sangre y por ella llega a todos los órganos de nuestra anatomía. El corazón se comportaría como un órgano endocrino con respecto a la SP, dado que todas las células cardiacas expresan SP. Se sabe que la SP es el principal mediador del dolor y la inflamación, por eso, ahora podría comprenderse aquello que siempre se pensó desde un punto de vista poético: el corazón siente.

Otra de las evidencias observadas en nuestro trabajo es la presencia de SP y NK1R en la totalidad de células del corazón humano y no solo relacionadas con el tejido nervioso. Es más, el hecho de que la SP y el NK1R se exprese tanto en el sistema límbico del SNC como en las estructuras cardiacas explicaría la interrelación existente entre el estado emocional y la actividad cardiaca. Así, aumentos de SP no solo actuarían en el sistema límbico, sino que también podrían actuar a nivel cardiaco. La traducción de este fenómeno en la clínica es bien conocido y, por ejemplo, el estrés emocional produce tanto ansiedad y depresión como fenómenos isquémicos miocárdicos. Por tanto, utilizando los antagonistas de los NK1R podríamos mejorar tanto el estrés emocional como el cardiaco.

Por último, respecto al patrón de expresión y distribución de la SP y NK1R en el corazón, hay que destacar cómo en edades tempranas de la vida (periodo neonatal y fetal) la expresión nuclear de SP en las células cardiacas es casi inexistente. Esta marcada diferencia con respecto a la edad adulta sugiere que se produce una inducción de la expresión nuclear de SP conforme aumenta la edad del sujeto. Como es conocido la síntesis de los péptidos tiene lugar a nivel citoplasmático en los ribosomas con posterior almacenamiento en vesículas. La expresión nuclear se explicaría por un fenómeno que guardaría relación con el tiempo. Los péptidos realizarían en primer lugar funciones citoplásmicas y una vez alcanzada la cantidad necesaria, podrían pasar a traslocarse en el núcleo. El ADN y los cromosomas transmiten la herencia de generaciones anteriores, sin embargo, las células se enfrentan a unas circunstancias en las que las generaciones anteriores no han podido conocer. Podría decirse que el ADN solo transmite memoria. Sin embargo la adaptación de las células al medio es algo que se realiza dependiendo de las circunstancias, de ahí que a nivel celular deba existir un rudimentario cerebro celular que la regule la expresión génica o lo que es lo mismo el comportamiento celular (Muñoz et al. 2015). De ahí que a medida que la célula vaya madurando su rudimentario cerebro celular se iría completando con más cantidad de moléculas neurotransmisoras y reguladores como la SP. De manera similar SP desempeña en el interior del núcleo de las células cardiacas sanas, coincidimos con la hipótesis planteada por Muñoz y colaboradores, que plantea que su elevada presencia intranuclear podría obedecer a que actúa como “neuromodulador genético” directamente sobre el ADN nuclear (Muñoz, Pavón, et al. 2010).

A diferencia de lo que ocurre con la SP, **la expresión de NK1R es predominantemente citoplasmática** tanto en adultos como en fetos y neonatos. Esto puede estar relacionado que los receptores se expresan habitualmente en la superficie de las células es decir en el membrana celular y ello es debido a que los neuropeptidos están regulando funciones citoplasmáticas y de señalización celular, que son funciones habituales en las células.

Aunque en los distintas muestras estudiadas hemos apreciado algunas diferencias en el patrón e intensidad de tinción entre células contiguas, éstas se hacen especialmente patentes en la expresión de SP a nivel de la aurícula derecha. Hemos observado cómo las células miocárdicas de la aurícula derecha, son las que presentan una mayor expresión nuclear de SP y que ésta aumenta de manera proporcional a la edad del sujeto estudiado.

Respecto a las limitaciones de nuestro trabajo hay que señalar que se trata de un estudio morfológico descriptivo y no dinámico. El diseño morfológico descriptivo de este estudio lleva implícito una serie de limitaciones que pueden haber tenido alguna influencia en los resultados obtenidos. Sin embargo, sirve para establecer las bases para estudios posteriores. Otra limitación sería el tamaño muestral y la imposibilidad de aplicar el método estadístico. Si bien es cierto, este es un trabajo pionero y semicuantitativo que no tiene por objetivo más que describir la expresión de este sistema peptidérgico en las células cardíacas. Por último, quizás no es del todo riguroso hablar de un único patrón morfológico de normalidad en la expresión inmunohistoquímica de SP y NK1R a nivel cardíaco, ya que, la ausencia de patología cardíaca no descarta que otras afecciones sistémicas puedan alterar los resultados. A pesar de lo dicho, consideramos que la elevada reproductibilidad y alto grado de coincidencia de los resultados hallados entre los diferentes casos estudiados sugiere que dichas limitaciones deben haber tenido un impacto limitado en las conclusiones finales de este trabajo.

Los hallazgos descritos en este trabajo demuestran la existencia de una expresión inmunohistoquímica tanto de SP como de NK1R en las células de las diferentes estructuras histológicas y funcionales del corazón de adulto, feto y neonato, atendiendo a un patrón que se repite de manera constante. Esto contribuye a la comprensión de la fisiopatología cardíaca y la influencia de la SP/NK1R en el corazón.

VI. RESUMEN

VI. RESUMEN

La Cardiología es uno de los campos de la Medicina que más avances ha experimentado en los últimos años Sin embargo, a pesar de las mejoras en el tratamiento y pronóstico, aún se desconocen los mecanismos íntimos que conducen al desarrollo de diversas patologías cardiacas y a la aparición de las cardiopatías congénitas. En las últimas décadas, el progreso de la Biología Molecular ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias tanto diagnósticas como terapéuticas. Así, tras el descubrimiento de los sistemas peptidérgicos y la identificación de diversos neuropéptidos como la sustancia P (SP), se ha desarrollado un nuevo paradigma en la terapia farmacológica que podría dar explicaciones a muchos interrogantes actuales y cambiar el rumbo de la Medicina actual.

La SP es un neuropéptido de la familia de las taquicininas que se localiza a nivel del sistema nerviosos central y periférico. Sin embargo, se ha descrito su expresión en localizaciones carentes de inervación como en células del sistema inmune, células endoteliales o células de Leydig e incluso en tejidos no inervados como la placenta. La SP y su receptor, el NK1R están implicados en la fisiología de múltiples procesos constituyendo la base molecular de diversas patologías humanas.

Hasta el momento no hay estudios publicados en relación a la presencia y distribución de la SP en el corazón humano fetal. El objetivo de este trabajo se centra en describir la presencia o ausencia de SP y NK1R en el corazón humano sano, desde la etapa fetal a la adulta.

Diseñamos un estudio piloto observacional descriptivo anatómico-morfológico en el que evaluamos de forma semicuantitativa la expresión y distribución inmunohistoquímica de la SP y NK1R en el corazón humano libre de enfermedad.

Se revisaron las muestras de tejido cardiaco de fetos, neonatos y adultos procedente de todas las autopsias realizadas en el Hospital Virgen del Rocío en el año 2012. De todas ellas (117 autopsias) se seleccionaron aquellas que cumplieran una serie de criterios de inclusión, excluyendo las que pudieran artefactar los

resultados obtenidos. De esta forma, los casos elegibles o que pudieran ser incluidos en la investigación se redujeron a 33. Finalmente, y mediante un muestreo aleatorio simple, se seleccionó una muestra representativa constituida por 10 autopsias que componen nuestra muestra de estudio final. De cada caso de estudio obtuvimos 9 muestras diferentes de tejido cardiaco correspondientes a las distintas zonas que quisimos estudiar. A su vez, de cada zona de tejido cardiaco se analizaron tres muestras correspondientes a la SP, NK1R y tinción con hematoxilina-eosina. De esta manera, el número total de muestras estudiadas ha sido de 270.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran por primera vez que tanto la SP como el NK1R se expresan en corazones de adultos, fetos y neonatos, siguiendo en cada grupo de edad un patrón de expresión y distribución que se repite de manera constante.

La inmunoreactividad a SP tiene un patrón citoplasmático en fetos y neonatos mientras que en adultos es predominantemente nuclear. En el miocardio, la SP se localiza predominantemente en las aurículas, donde la inmunoreactividad es fundamentalmente nuclear. En los ventrículos, por el contrario, la inmunoreactividad es citoplasmática. En las células mesoteliales del epicardio, la inmunoreactividad a SP y NK1R es mayor en el núcleo que en el citoplasma. Los miocitos de conducción presentan un patrón característico con una inmunoreactividad a SP y NK1R que se incrementa con la edad tanto a nivel nuclear como citoplásmico. Las arterias coronarias de fetos y neonatos expresan SP y NK1R a nivel citoplasmático. Por el contrario, en las arterias coronarias de adultos, la inmunoreactividad a SP es predominantemente nuclear mientras que NK1R tiene una expresión citoplásmica. En el tejido valvular la inmunoreactividad a SP y NK1R se localiza en la capa endocardica siendo muy débil en el resto de tejido valvular. La inmunoreactividad a SP en los grandes vasos es similar en el citoplasma y en el núcleo de las células endoteliales. Sin embargo la inmunoreactividad a NK1R es fundamentalmente citoplasmática.

Estos hallazgos establecen las bases anatomofuncionales que permiten mejorar el conocimiento de la fisiología del corazón humano y ahondar en la comprensión de las enfermedades en las que exista una sobreexpresión del complejo SP-NK1R. Además tiene una implicación terapéutica esencial, pues mediante los antagonistas del NK1R, podrían bloquearse todos los efectos que la SP a través del RNK1 produce en el corazón, pudiendo así modificar la evolución y pronóstico de diversas enfermedades cardiacas.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. Se describe por primera vez el patrón de expresión de la SP y el NK1R en el corazón humano desde la etapa fetal a la edad adulta.
2. La inmunoreactividad a SP y NK1R es universal en todas las estructuras y en todo tipo de células del corazón humano.
3. La inmunoreactividad a SP tiene un patrón citoplasmático en fetos y RN.
4. La inmunoreactividad a SP en el miocardio se localiza predominantemente en las aurículas.
5. La inmunoreactividad a SP en las aurículas es predominantemente nuclear y a nivel ventricular es citoplasmática.
6. La inmunoreactividad a SP en adultos es predominantemente nuclear y en RN y Fetos es predominantemente citoplasmática.
7. La inmunoreactividad a SP y NK1R en las células mesoteliales del epicardio es mayor en el núcleo que en el citoplasma.
8. La inmunoreactividad a SP y NK1R en los miocitos de conducción se incrementa con la edad tanto a nivel nuclear como citoplasmático.
9. En las arterias coronarias, la inmunoreactividad a SP y NK1R es predominantemente citoplasmática en las células mesoteliales y en las células miocárdicas, excepto la inmunoreactividad a SP en el adulto que es nuclear.
10. En el tejido valvular la inmunoreactividad a SP y NK1R se localiza en la capa endocárdica.
11. La inmunoreactividad a SP en los grandes vasos es similar en el citoplasma y en el núcleo de las células endoteliales. Sin embargo la inmunoreactividad a NK1R es mayor en el citoplasma de las células endoteliales.
12. La inmunoreactividad a SP y NK1R en el tejido conjuntivo es débil en todas sus localizaciones y en todas las edades.
13. La expresión de SP/NK1R en las estructuras cardíacas abre la puerta a una mejor comprensión de la fisiología y la fisiopatología mediada por este sistema, así mismo amplía la posibilidad desde el punto de vista terapéutico del uso de los antagonistas de los NK1R en la patología cardíaca mediada por SP/NK1R.

VIII. ANEXOS

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Comité de Ética de la Investigación

ANEXO 2: Acuerdo de Cesión de Muestras Biológicas para Investigación



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

ROBERTO MARÍN GIL

SECRETARIO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

Que dicho Comité ha revisado la solicitud del proyecto **“Inmunolocalización de la sustancia P y del receptor NK-1 en el corazón humano desde la etapa fetal al periodo neonatal”** cuyo investigador principal es la **Dra. Ana Méndez** para la utilización de muestras biológicas que no fueron recogidas con consentimiento informado específico para dicho estudio.

La Ley de Investigación Biomédica 14/2007 establece que de forma excepcional podrán tratarse muestras codificadas o identificadas con fines de investigación biomédica sin el consentimiento del sujeto fuente, cuando la obtención de dicho consentimiento no sea posible o represente un esfuerzo no razonable y se den las siguientes circunstancias:

- a) Que se trate de una investigación de interés general.
- b) Que la investigación se lleve a cabo por la misma institución que solicitó el consentimiento para la obtención de muestras.
- c) Que la investigación sea menos efectiva o no sea posible sin los datos identificativos del sujeto fuente.
- d) Que no conste una objeción expresa del mismo y que se garantice la confidencialidad de los datos de carácter personal.

Este Comité considera que la citada solicitud, no presenta impedimentos éticos o legales, en consecuencia, emite su autorización.

Y para que así conste, firmo la presente, en Sevilla, a 28 de enero de 2014

Fdo:



Roberto Marín Gil
Secretario
Comité Ética de la Investigación
Hospital Universitario Virgen del Rocío

ANEXO 1: Comité de Ética de la Investigación (1/1)



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIÓN

Código de solicitud: 33130085

En Sevilla, a 30 de Julio de 2014

REUNIDOS

De una parte, Dra. Blanca Miranda Serrano, con NIF 05.356.518-W, Coordinadora del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, con domicilio a efectos del presente acuerdo en el Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Centro de Investigación Biomédica, de Armilla (Granada).

Y de otra, D/D^a. Ana Méndez Santos responsable de la investigación (en adelante destinatario), con domicilio a estos efectos en Hospital Universitario Virgen del Rocío, Av/Manuel Siurot s/n 41013 Sevilla.

Las partes se reconocen recíprocamente la capacidad jurídica necesaria para suscribir el presente acuerdo, y, a tal efecto,

EXPONEN

Primero.- En el seno del Servicio Andaluz de Salud (SAS) se ha organizado el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (en lo sucesivo Biobanco del SSPA), establecimiento público, sin ánimo de lucro, que conserva y distribuye diversas muestras biológicas, las cuales constituyen un excelente elemento para la investigación biomédica.

Segundo.- El destinatario, como responsable de la investigación, adscrito a Hospital Universitario Virgen del Rocío, de conformidad con lo dispuesto en la normativa vigente, solicitó, en fecha 04/09/2013, las muestras biológicas y/o datos indicados en el Anexo de este acuerdo al SAS, a través del Biobanco del SSPA, para la realización de un proyecto de investigación.

Tercero.- En dicha solicitud consta el proyecto y la misma se acompañaba del dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, y Comité Científico que evaluaron el proyecto.

Cuarto.- La cesión ha sido informada de forma positiva por los comités científicos y de ética del Biobanco, así como por la persona titular de la dirección científica del mismo.

Quinto.- De conformidad con lo anterior, y en cumplimiento de lo dispuesto en la normativa vigente, las partes convienen la firma del presente acuerdo de cesión de muestras biológicas, según las siguientes:

ANEXO 2: Acuerdo de Cesión de Muestras Biológicas para Investigación (1/8)



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

ESTIPULACIONES

PRIMERA.- OBJETO

El objeto de este acuerdo es regular la cesión de muestras biológicas y los datos asociados a las mismas (en adelante muestras biológicas) por parte del SAS (cedente), a través del Biobanco del SSPA al destinatario.

Las muestras biológicas que se ceden en virtud de este acuerdo son las que se especifican en el Anexo. Las muestras biológicas a las que se refiere el presente acuerdo incluirán las muestras y los subproductos derivados.

A partir de la firma del presente acuerdo, el destinatario estará autorizado para el empleo de las muestras biológicas en el proyecto de tesis doctoral *Inmunolocalización de la sustancia P y del receptor NK-1 en el corazón humano desde la etapa fetal al periodo neonatal*, que consiste en

La SP es un péptido perteneciente al grupo de las taquicininas (TK), cuya estructura fue identificada en el año 1970. Otros miembros de la familia de las taquicininas que se han descrito en mamíferos son la NKA, NKB, Neuropéptido K (NPK), Neuropéptido gamma (NP_γ), y HK1. De los once aminoácidos que conforman la SP (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂) la secuencia correspondiente al extremo carboxi terminal tiene un papel fundamental en la actividad de esta molécula, la cual regula numerosas funciones biológicas al unirse a su receptor de membrana específico, el receptor de la neurkinina 1 (RNK-1). La SP se encuentra, no sólo en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) como clásicamente se ha pensado, sino que se produce también en células no neurales, estando ampliamente distribuida por todo el organismo e implicada en numerosas funciones biológicas. Sus efectos están mediados por los receptores taquicinérgicos (receptores acoplados a proteínas G o GPCRs) que son proteínas de siete dominios transmembrana y de todos ellos el mejor caracterizado es el RNK1. Así la SP actúa como agonista del RNK1 y uniéndose a él ejerce su acción. En el sistema nervioso central está implicada en diversas funciones endocrinas y autonómicas, en el control de actividades motoras y sensoriales así como en procesos de memoria. En tejidos periféricos la SP actúa a nivel del sistema visual, en el aparato digestivo, el sistema respiratorio, órganos genitales, el sistema urinario, piel, sistema inmune. También se ha descubierto la presencia del receptor NK1 en células tumorales desempeñando un importante papel en la génesis del cáncer.

La SP es uno de los vasodilatadores más potentes conocidos. Existen publicaciones recientes que demuestran la existencia de SP en el corazón, vasos sanguíneos o cuerpo

v.02

Página 2 de 8

ANEXO 2: Acuerdo de Cesión de Muestras Biológicas para Investigación (2/8)



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

carotídeo. Algunos estudios realizados en cobayas, perros o gatos indican que las aurículas, ventrículos o vasos coronarios expresan SP y que ésta podría estar relacionada con el dolor en la isquemia cardíaca o con la inflamación que se produce en determinadas enfermedades como la miocarditis. Además, la SP es un neurotransmisor activador, su presencia en el sistema de conducción cardíaca podría implicarla en un papel como regulador de la misma.

Sin embargo, no existen publicaciones sobre la localización de receptores NK1 y SP en corazones humanos o sobre su existencia en etapas iniciales de la vida fetal y neonatal, tratándose por tanto, de un campo interesante que plantea futuras investigaciones.

SEGUNDA.- OBLIGACIONES DEL DESTINATARIO

El destinatario queda obligado a:

- a) Usar las muestras biológicas de acuerdo con la normativa de aplicación y especialmente con lo preceptuado en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, así como, en su caso, la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, y la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, en lo que resulte de aplicación, y a llevar a cabo las actividades de investigación respetando en todo caso las medidas de precaución necesarias.
- b) Utilizar las muestras biológicas con el fin único y exclusivo de llevar a cabo el proyecto de investigación indicado en la estipulación primera, quedando prohibido usar las mismas fuera de dicho proyecto, así como ceder completa o parcialmente las muestras objeto de este acuerdo a cualquier tercero.
- c) Asegurar la trazabilidad de las muestras biológicas mientras estén en su poder.
- d) Garantizar la disponibilidad de la información genética validada y relevante para la salud que, en su caso, se obtenga del análisis de las muestras biológicas.
- e) Observar el reglamento interno de funcionamiento del Biobanco del SSPA, publicado en su página web, en lo que resulte aplicable.
- f) Destruir o devolver al SAS, a través del Biobanco del SSPA, el excedente que pudiera existir una vez finalizado el proyecto, siguiendo las indicaciones de dicha institución, que podrá solicitar su devolución si se trata de muestras infrecuentes o de las que se tenga poca cantidad.
- g) Devolver al SAS, a través del Biobanco del SSPA, las muestras biológicas cedidas en el supuesto de que no fueran utilizadas o el proyecto no fuese desarrollado en el plazo de 6 meses, corriendo con los gastos derivados de dicha devolución.

v.02

Página 3 de 8

ANEXO 2: Acuerdo de Cesión de Muestras Biológicas para Investigación (3/8)



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

- h) Identificar adecuadamente al Biobanco del SSPA como la fuente de la que ha obtenido las muestras biológicas en toda publicación o comunicación sobre las investigaciones en que se hayan utilizado dichas muestras.
- i) Comunicar al Biobanco del SSPA los resultados del proyecto de investigación para facilitar el correcto seguimiento de los resultados derivados de los estudios realizados con las muestras, de conformidad con lo establecido en la estipulación quinta.
- j) Asegurar que todas las personas que participen en el proyecto de investigación usarán las muestras únicamente en los términos reflejados en el presente documento, comprometiéndose a velar para que todas las personas que colaboren en el proyecto cumplan este compromiso.
- k) Asumir el coste derivado de la entrega de las muestras biológicas, de conformidad con lo dispuesto en la estipulación siguiente.

TERCERA.- ENVÍO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS Y REPERCUSIÓN DE COSTES

Las muestras biológicas serán enviadas al destinatario, a la dirección indicada en el presente documento, asumiendo éste los costes derivados del envío de las muestras biológicas, así como la parte proporcional de los gastos derivados de la obtención, mantenimiento, manipulación y otros gastos de similar naturaleza, de conformidad con la normativa vigente, según tarifas publicadas en la página web del Biobanco del SSPA y/o, en su caso, los precios públicos que resultaran aplicables.

La Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, entidad gestora del Biobanco del SSPA, emitirá la correspondiente factura, derivada de las actividades relacionadas con el presente acuerdo, que deberá ser abonada por el destinatario en el plazo de treinta (30) días desde la recepción de la misma en la cuenta bancaria 0182 5566 79 0011503217, de la que la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud es titular.

De conformidad con el artículo 34.3 del Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, las muestras biológicas y los datos asociados sólo se cederán, por regla general, de forma anónima o disociada. Si la naturaleza del proyecto de investigación requiriese disponer de datos clínicos adicionales acerca de los sujetos fuente, el Biobanco del SSPA coordinará la obtención de esta información con el centro donde se obtuvo la muestra, siempre que ésta no haya sido anonimizada.

CUARTA.- BIOSEGURIDAD

Las muestras biológicas transferidas por el presente acuerdo podrían estar contaminadas por agentes patógenos para el hombre. En estos casos, la normativa de bioseguridad obliga a considerar las muestras como potencialmente contaminadas. Los investigadores implicados deberán conocer y aplicar las medidas de protección necesarias para su manejo.



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

No obstante a lo anterior, los procedimientos para la obtención, transporte, almacenamiento, manipulación y envío de muestras por parte del Biobanco se efectúan en condiciones de bioseguridad, de conformidad con la legislación vigente.

QUINTA.- COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

El destinatario se compromete a enviar al SAS, a través del Biobanco del SSPA, en el plazo de seis (6) meses desde la finalización del proyecto, una memoria de la investigación realizada con las conclusiones generales del estudio, siempre y cuando el autor haya publicado los resultados o se haya desestimado o renunciado a dicha publicación.

El SAS podrá hacer públicas dichas conclusiones, siempre que ello no suponga una interferencia de cara a la protección de los derechos de propiedad industrial o intelectual derivados de los resultados del proyecto.

Asimismo, el destinatario enviará al SAS, a través del Biobanco, transcurridos 2 años desde la finalización del proyecto de investigación, una copia de los artículos científicos publicados que se deriven de la investigación realizada empleando las muestras biológicas a las que se refiere el presente acuerdo.

El destinatario se compromete a comunicar al SAS, a través del Biobanco del SSPA, cualquier dato clínicamente relevante del sujeto fuente y/o de sus familiares, siempre que las muestras biológicas no hayan sido anonimizadas con carácter previo a la cesión.

El SAS se reserva el derecho de recabar informes del destinatario y a los miembros del equipo del proyecto acerca de la utilización de las muestras biológicas y realizar un seguimiento de los resultados obtenidos con las mismas.

SEXTA.- DERECHOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y/O INTELLECTUAL Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS

[(Elegir a) (o b), en el caso que proceda]

a) Para el supuesto de que la intervención del SAS se limite a ceder las muestras biológicas, a través del Biobanco del SSPA:

La intervención del SAS se limita a ceder, a través del Biobanco del SSPA, muestras biológicas para el desarrollo del proyecto. Por tanto, los derechos de explotación de los resultados obtenidos en el desarrollo del mismo, sean o no protegibles por derechos de propiedad industrial y/o intelectual, pertenecerán al destinatario o a la institución a la que esté adscrito, según corresponda de conformidad con la normativa aplicable en la materia, renunciando el SAS a ejercer cualquier reclamación respecto a dichos derechos.

ANEXO 2: Acuerdo de Cesión de Muestras Biológicas para Investigación (5/8)



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

(b) Redacción para el supuesto de colaboración:

Si además de aportar las muestras biológicas, existe una colaboración entre ambas partes, la explotación de los resultados, protegibles o no, obtenidos en el desarrollo del proyecto en el que participen investigadores que desarrollan su actividad en Biobanco y el destinatario se regulará en el oportuno convenio de colaboración que al efecto se suscriba entre las entidades a las que se encuentren adscritos. En dicho convenio se acordarán los términos de explotación industrial y/o intelectual y comercialización de dichos resultados, así como el régimen de cotitularidad sobre los mismos, que se determinarán en proporción al esfuerzo y participación de las partes en el proyecto. Cualquiera de las partes vendrá obligada a comunicar inmediatamente y por escrito a la otra la obtención de dichos resultados de investigación.

SÉPTIMA.- VIGENCIA

El presente acuerdo entrará en vigor en el momento de su firma y tendrá la vigencia del proyecto de investigación, salvo que sea extinguido de conformidad con lo dispuesto en la estipulación siguiente.

OCTAVA.- EXTINCIÓN DEL ACUERDO

El presente acuerdo quedará extinguido:

- a) Por mutuo acuerdo de las partes.
- b) Por finalizar la vigencia del presente acuerdo.
- c) Por falta de utilización de las muestras biológicas, según lo estipulado en la estipulación segunda de este acuerdo.
- d) Por el incumplimiento de las obligaciones derivadas del presente acuerdo, que no sea subsanado en el plazo de treinta (30) días siguientes a la recepción de la notificación escrita de la parte que aprecie el incumplimiento, identificando dicho incumplimiento y reclamando su subsanación.

Si el presente acuerdo fuera extinguido por cualquiera de dichos motivos y existiera un excedente de muestras biológicas, el destinatario procederá de acuerdo con las instrucciones del Biobanco del SSPA respecto a la devolución o destrucción de las mismas, asumiendo los costes derivados de la devolución o destrucción y comunicando de forma fehaciente tal extremo al Biobanco, una vez realizada la operación correspondiente.

NOVENA.- RESOLUCIÓN DE CONFLICTOS

Las partes se comprometen a tratar de resolver amistosamente cualquier diferencia que sobre el presente acuerdo pudiera surgir.

v.02

Página 6 de 8

ANEXO 2: Acuerdo de Cesión de Muestras Biológicas para Investigación (6/8)



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

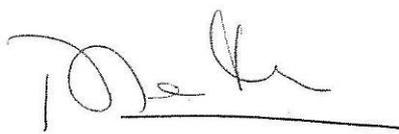
destrucción y comunicando de forma fehaciente tal extremo al Biobanco, una vez realizada la operación correspondiente.

NOVENA.- RESOLUCIÓN DE CONFLICTOS

Las partes se comprometen a tratar de resolver amistosamente cualquier diferencia que sobre el presente acuerdo pudiera surgir.

En el caso en que no fuera posible llegar a una solución amistosa, para la resolución de cuantas cuestiones litigiosas pudieren surgir en relación con la interpretación, validez, eficacia o cumplimiento del presente acuerdo, las partes renunciando a su propio fuero, se someten a la competencia de los Juzgados de Granada.

Y en prueba de conformidad con cuanto antecede, firman por duplicado ejemplar, aunque a un solo efecto, en la fecha consignada en el encabezamiento.

	
Fdo. D ^a . Blanca Miranda Serrano Coordinadora del Biobanco del SSPA	Fdo. D. Ana Méndez Santos Destinatario



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

ANEXO

MUESTRAS BIOLÓGICAS Y DATOS CLÍNICOS ASOCIADOS CEDIDOS

Los tipos de biorrecursos que se van a proveer y el número quedará reflejado en la suma de los documentos de transacción (albaranes) entregados.

CALENDARIO DE CESIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

- Una única entrega. Fecha prevista:

- Varias entregas. Fechas previstas:

ANEXO 2: Acuerdo de Cesión de Muestras Biológicas para Investigación (8/8)

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abboud, F. M. (1996). "An intrinsic cardiac adrenergic system can regulate cardiac development and function." *J Clin Invest* **98**(6): 1275-1276.
- Ades, S., M. Halyard, K. Wilson, T. Ashikaga, R. Heimann, S. Kumar and W. Blackstock (2016). "Effectiveness of aprepitant in addition to ondansetron in the prevention of nausea and vomiting caused by fractionated radiotherapy to the upper abdomen (AVERT)." *Support Care Cancer*.
- Alberts , A. J., Julian Lewis , Martin Raff , Keith Roberts , and Peter Walter (2014). *Molecular Biology of the Cell*.
- Allen, J. M., N. R. Hoyle, J. C. Yeats, M. A. Ghatei, D. G. Thomas and S. R. Bloom (1985). "Neuropeptides in neurological tumours." *J Neurooncol* **3**(3): 197-202.
- Allred, D. C., G. M. Clark, R. Elledge, S. A. Fuqua, R. W. Brown, G. C. Chamness, C. K. Osborne and W. L. McGuire (1993). "Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer." *J Natl Cancer Inst* **85**(3): 200-206.
- Allred, D. C., J. M. Harvey, M. Berardo and G. M. Clark (1998). "Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis." *Mod Pathol* **11**(2): 155-168.
- Alm, P., J. Alumets, E. Brodin, R. Håkanson, G. Nilsson, N. O. Sjöberg and F. Sundler (1978). "Peptidergic (substance P) nerves in the genito-urinary tract." *Neuroscience* **3**(4-5): 419-425.
- Almeida, T. A., J. Rojo, P. M. Nieto, F. M. Pinto, M. Hernandez, J. D. Martín and M. L. Candenás (2004). "Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships." *Curr Med Chem* **11**(15): 2045-2081.
- Amadesi, S., C. Reni, R. Katare, M. Meloni, A. Oikawa, A. P. Beltrami, E. Avolio, D. Cesselli, O. Fortunato, G. Spinetti, R. Ascione, E. Cangiano, M. Valgimigli, S. P. Hunt, C. Emanuelli and P. Madeddu (2012). "Role for substance p-based nociceptive signaling in progenitor cell activation and angiogenesis during ischemia in mice and in human subjects." *Circulation* **125**(14): 1774-1786, S1771-1719.
- Ardell, J. L. and W. C. Randall (1986). "Selective vagal innervation of sinoatrial and atrioventricular nodes in canine heart." *Am J Physiol* **251**(4 Pt 2): H764-773.
- Armour, J. A. (2008). "Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart." *Experimental Physiology* **93**(2): 165-176.
- Armour, J. A. and J. L. Ardell (2004). *Basic and clinical neurocardiology*. Oxford ; New York, Oxford University Press.
- Armour, J. A., D. A. Murphy, B. X. Yuan, S. Macdonald and D. A. Hopkins (1997). "Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system." *Anat Rec* **247**(2): 289-298.
- Armstrong, D. M., V. M. Pickel, T. H. Joh, D. J. Reis and R. J. Miller (1981). "Immunocytochemical localization of catecholamine synthesizing enzymes and neuropeptides in area postrema and medial nucleus tractus solitarius of rat brain." *J Comp Neurol* **196**(3): 505-517.

- Baertschi, A. J., H. H. Zingg and J. J. Dreifuss (1981). "Enkephalins, substance P, bradykinin and angiotensin II: differential sites of action on the hypothalamo-neurohypophysial system." *Brain Res* **220**(1): 107-119.
- Balan, R., N. Simion, S. E. Giuşcă, A. Grigoraş, L. Gheucă-Solovăstru, V. Gheorghişă, C. Amălinei and I. D. Căruntu (2011). "Immunohistochemical assessment of p16, COX-2 and EGFR in HPV-positive cervical squamous intraepithelial lesions." *Rom J Morphol Embryol* **52**(4): 1187-1194.
- Bandari, P. S., J. Qian, H. S. Oh, J. A. Potian, G. Yehia, J. S. Harrison and P. Rameshwar (2003). "Crosstalk between neurokinin receptors is relevant to hematopoietic regulation: cloning and characterization of neurokinin-2 promoter." *J Neuroimmunol* **138**(1-2): 65-75.
- Bang, R., G. Sass, A. K. Kiemer, A. M. Vollmar, W. L. Neuhuber and G. Tiegs (2003). "Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury." *J Pharmacol Exp Ther* **305**(1): 31-39.
- Baptista, V., Z. L. Zheng, F. H. Coleman, R. C. Rogers and R. A. Travagli (2005). "Characterization of neurons of the nucleus tractus solitarius pars centralis." *Brain Res* **1052**(2): 139-146.
- Bargmann, W. and B. von Gaudecker (1969). "[The ultrastructure of neurosecretory elementary granules]." *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **96**(4): 495-504.
- Barrett, S. B., Scott Boitano, Heddwen (2012). *Ganong's Review of Medical Physiology*, 24th Edition.
- Baştürk, E., M. Kement, D. Yavuzer, S. Vural, C. Gezen, H. I. Gözü, A. Karadayı and M. Oncel (2012). "The role of insulin-like growth factor 1 in the development of benign and malignant thyroid nodules." *Balkan Med J* **29**(2): 133-138.
- Beaujouan, J. C., M. Saffroy, Y. Torrens and J. Glowinski (2000). "Different subtypes of tachykinin NK(1) receptor binding sites are present in the rat brain." *J Neurochem* **75**(3): 1015-1026.
- Beaujouan, J. C., M. Saffroy, Y. Torrens, S. Sagan and J. Glowinski (1999). "Pharmacological characterization of tachykinin septide-sensitive binding sites in the rat submaxillary gland." *Peptides* **20**(11): 1347-1352.
- Beaujouan, J. C., Y. Torrens, M. Saffroy, M. L. Kemel and J. Glowinski (2004). "A 25 year adventure in the field of tachykinins." *Peptides* **25**(3): 339-357.
- Bengel, F. M. (2011). "Imaging targets of the sympathetic nervous system of the heart: translational considerations." *J Nucl Med* **52**(8): 1167-1170.
- Benjannet, S., N. G. Seidah, R. Routhier and M. Chrétien (1980). "A novel human pituitary peptide containing the gamma-MSH sequence." *Nature* **285**(5764): 415-416.
- Berger, M., O. Neth, M. Ilmer, A. Garnier, M. V. Salinas-Martín, J. C. de Agustín Asencio, D. von Schweinitz, R. Kappler and M. Muñoz (2014). "Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo." *J Hepatol* **60**(5): 985-994.
- Bigioni, M., A. Benzo, C. Irrissuto, C. A. Maggi and C. Goso (2005). "Role of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231." *Anticancer Drugs* **16**(10): 1083-1089.
- Björklund, A., T. Hökfelt and M. Tohyama (1992). *Ontogeny of transmitters and peptides in the CNS*. Amsterdam ; New York, Elsevier.

- Bjørndal, K., S. R. Larsen, C. Godballe and A. Krogdahl (2011). "Osteopontin expression in salivary gland carcinomas." *J Oral Pathol Med* **40**(6): 451-455.
- Bondy, B., T. C. Baghai, C. Minov, C. Schüle, M. J. Schwarz, P. Zwanzger, R. Rupprecht and H. J. Möller (2003). "Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results." *Biol Psychiatry* **53**(6): 538-542.
- Bradford (1988). *Fundamentos de Neuroquímica*. Barcelona, Editorial Labor.
- Brum, J. M., V. L. Go, Q. Sufan, G. Lane, W. Reilly and A. A. Bove (1986). "Substance P distribution and effects in the canine epicardial coronary arteries." *Regul Pept* **14**(1): 41-55.
- Burnstock, G. (1985). "Nervous control of smooth muscle by transmitters, cotransmitters and modulators." *Experientia* **41**(7): 869-874.
- Böckmann, S., J. Seep and L. Jonas (2001). "Delay of neutrophil apoptosis by the neuropeptide substance P: involvement of caspase cascade." *Peptides* **22**(4): 661-670.
- Böhm, S. K., L. M. Khitin, S. P. Smeekens, E. F. Grady, D. G. Payan and N. W. Bunnett (1997). "Identification of potential tyrosine-containing endocytic motifs in the carboxyl-tail and seventh transmembrane domain of the neurokinin 1 receptor." *J Biol Chem* **272**(4): 2363-2372.
- Bünemann, M. and M. M. Hosey (1999). "G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling." *J Physiol* **517** (Pt 1): 5-23.
- Caberlotto, L., Y. L. Hurd, P. Murdock, J. P. Wahlin, S. Melotto, M. Corsi and R. Carletti (2003). "Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain." *Eur J Neurosci* **17**(9): 1736-1746.
- Cahill, C. M. and T. J. Coderre (2002). "Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist." *Pain* **95**(3): 277-285.
- Cajal (1923). *Recuerdos de mi vida. Historia de mi labor científica*.
- Cajal, S. R. (1888). *Estructura de los centros nerviosos de las aves*. *Revista Trimestral de Histología Normal y Patológica*. **1**: 1-10.
- Cajal, S. R. (1892). *El nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos*. *Revista de ciencias Médicas*. **18**: 457-476.
- Calvo, C. F., G. Chavanel and A. Senik (1992). "Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells." *J Immunol* **148**(11): 3498-3504.
- Camras, C. B. and L. Z. Bito (1980). "The pathophysiological effects of nitrogen mustard on the rabbit eye. II. The inhibition of the initial hypertensive phase by capsaicin and the apparent role of substance P." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **19**(4): 423-428.
- Candenas, L., A. Lecci, F. M. Pinto, E. Patak, C. A. Maggi and J. N. Pennefather (2005). "Tachykinins and tachykinin receptors: effects in the genitourinary tract." *Life Sci* **76**(8): 835-862.
- Cao, Y. Q., P. W. Mantyh, E. J. Carlson, A. M. Gillespie, C. J. Epstein and A. I. Basbaum (1998). "Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain." *Nature* **392**(6674): 390-394.
- Cañete, H., I. Dorta, M. Hernández, A. Cejudo Roman, L. Candenas, F. M. Pinto, F. Valladares, D. Báez, F. Montes de Oca, A. R. Bello and T. A. Almeida (2013). "Differentially regulated expression of neurokinin B (NKB)/NK3 receptor system in uterine leiomyomata." *Hum Reprod* **28**(7): 1799-1808.

- Chang, M. M. and S. E. Leeman (1970). "Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P." J Biol Chem **245**(18): 4784-4790.
- Chang, M. M., S. E. Leeman and H. D. Niall (1971). "Amino-acid sequence of substance P." Nat New Biol **232**(29): 86-87.
- Chang, Y., D. B. Hoover, J. C. Hancock and F. M. Smith (2000). "Tachykinin receptor subtypes in the isolated guinea pig heart and their role in mediating responses to neurokinin A." J Pharmacol Exp Ther **294**(1): 147-154.
- Chizh, B. A., M. Göhring, A. Tröster, G. K. Quartey, M. Schmelz and W. Koppert (2007). "Effects of oral pregabalin and aprepitant on pain and central sensitization in the electrical hyperalgesia model in human volunteers." Br J Anaesth **98**(2): 246-254.
- Church, D. J., S. J. Arkininstall, M. B. Vallotton, A. Chollet, E. Kawashima and U. Lang (1996). "Stimulation of atrial natriuretic peptide release by neurokinins in neonatal rat ventricular cardiomyocytes." Am J Physiol **270**(3 Pt 2): H935-944.
- Ciarleglio, A. E., M. C. Beinfeld and T. C. Westfall (1993). "Pharmacological characterization of the release of neuropeptide Y-like immunoreactivity from the rat hypothalamus." Neuropharmacology **32**(8): 819-825.
- Corr, L. (1992). "Neuropeptides and the conduction system of the heart." Int J Cardiol **35**(1): 1-12.
- Cottrell, G. S., B. E. Padilla, S. Amadesi, D. P. Poole, J. E. Murphy, M. Hardt, D. Roosterman, M. Steinhoff and N. W. Bunnett (2009). "Endosomal endothelin-converting enzyme-1: a regulator of beta-arrestin-dependent ERK signaling." J Biol Chem **284**(33): 22411-22425.
- Council for International Organizations of Medical (2002). "International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects." Bull Med Ethics(182): 17-23.
- Crick, S. J., J. Wharton, M. N. Sheppard, D. Royston, M. H. Yacoub, R. H. Anderson and J. M. Polak (1994). "Innervation of the human cardiac conduction system. A quantitative immunohistochemical and histochemical study." Circulation **89**(4): 1697-1708.
- D'Souza, M., M. A. Garza, M. Xie, J. Weinstock, Q. Xiang and P. Robinson (2007). "Substance P is associated with heart enlargement and apoptosis in murine dilated cardiomyopathy induced by *Taenia crassiceps* infection." J Parasitol **93**(5): 1121-1127.
- Dale, H. (1935). Pharmacology and Nerve-endings (Walter Ernest Dixon Memorial Lecture: Section of Therapeutics and Pharmacology). Proc R Soc Med, **28**(3), 319-332.
- Dalsgaard, C. J., A. Franco-Cereceda, A. Saria, J. M. Lundberg, E. Theodorsson-Norheim and T. Hökfelt (1986). "Distribution and origin of substance P- and neuropeptide Y-immunoreactive nerves in the guinea-pig heart." Cell Tissue Res **243**(3): 477-485.
- Dalsgaard, C. J., C. E. Jonsson, T. Hökfelt and A. C. Cuello (1983). "Localization of substance P-immunoreactive nerve fibers in the human digital skin." Experientia **39**(9): 1018-1020.
- Davis CL (1927). "Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites." Contrib Embryol(19): 245-284.

- De Felipe, C., J. F. Herrero, J. A. O'Brien, J. A. Palmer, C. A. Doyle, A. J. Smith, J. M. Laird, C. Belmonte, F. Cervero and S. P. Hunt (1998). "Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P." Nature **392**(6674): 394-397.
- De La Cruz, M. V., C. Sanchez-Gomez and M. A. Palomino (1989). "The primitive cardiac regions in the straight tube heart (Stage 9) and their anatomical expression in the mature heart: An experimental study in the chick embryo." J Anat **165**: 121-131.
- De Swert, K. O. and G. F. Joos (2006). "Extending the understanding of sensory neuropeptides." Eur J Pharmacol **533**(1-3): 171-181.
- DeFea, K. A., Z. D. Vaughn, E. M. O'Bryan, D. Nishijima, O. Déry and N. W. Bunnnett (2000). "The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11086-11091.
- DeFea, K. A., J. Zalevsky, M. S. Thoma, O. Déry, R. D. Mullins and N. W. Bunnnett (2000). "beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2." J Cell Biol **148**(6): 1267-1281.
- Dehlin, H. M. and S. P. Levick (2014). "Substance P in heart failure: the good and the bad." Int J Cardiol **170**(3): 270-277.
- DeVane, C. L. (2001). "Substance P: a new era, a new role." Pharmacotherapy **21**(9): 1061-1069.
- Douglas, S. D., J. P. Lai, F. Tuluc, L. Schwartz and L. E. Kilpatrick (2008). "Neurokinin-1 receptor expression and function in human macrophages and brain: perspective on the role in HIV neuropathogenesis." Ann N Y Acad Sci **1144**: 90-96.
- Du Vigneaud, V. (1969). "Hormones of the mammalian posterior pituitary gland and their naturally occurring analogues." Johns Hopkins Med J **124**(2): 53-65.
- Dvorakova, M. C., P. Kruzliak and S. W. Rabkin (2014). "Role of neuropeptides in cardiomyopathies." Peptides **61**: 1-6.
- Déry, O., K. A. Defea and N. W. Bunnnett (2001). "Protein kinase C-mediated desensitization of the neurokinin 1 receptor." Am J Physiol Cell Physiol **280**(5): C1097-1106.
- Eckenstein, F. and R. W. Baughman (1984). "Two types of cholinergic innervation in cortex, one co-localized with vasoactive intestinal polypeptide." Nature **309**(5964): 153-155.
- Eguiagaray, J. G., J. Egea, J. J. Bravo-Cordero and A. G. Garcia (2004). "[Neurotransmitters, calcium signalling and neuronal communication]." Neurocirugia (Astur) **15**(2): 109-118.
- Evans, T. W., C. M. Dixon, B. Clarke, T. B. Conradson and P. J. Barnes (1988). "Comparison of neurokinin A and substance P on cardiovascular and airway function in man." Br J Clin Pharmacol **25**(2): 273-275.
- Fiebich, B. L., S. Schleicher, R. D. Butcher, A. Craig and K. Lieb (2000). "The neuropeptide substance P activates p38 mitogen-activated protein kinase resulting in IL-6 expression independently from NF-kappa B." J Immunol **165**(10): 5606-5611.
- Florea, V. G. and J. N. Cohn (2014). "The Autonomic Nervous System and Heart Failure." Circ Res **114**(11): 1815-1826.

- Flórez, J., J. A. Armijo and A. Mediavilla (2013). Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En: *Farmacología humana*.
- Folkers, K., R. Håkanson, J. Hörig, J. C. Xu and S. Leander (1984). "Biological evaluation of substance P antagonists." *Br J Pharmacol* **83**(2): 449-456.
- Fong, T. M., S. A. Anderson, H. Yu, R. R. Huang and C. D. Strader (1992). "Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor." *Mol Pharmacol* **41**(1): 24-30.
- Foreman, R. D., K. M. Garrett and R. W. Blair (2015). "Mechanisms of cardiac pain." *Compr Physiol* **5**(2): 929-960.
- Fouron, J. C. (2003). "The unrecognized physiological and clinical significance of the fetal aortic isthmus." *Ultrasound Obstet Gynecol* **22**(5): 441-447.
- García Recio, S. (2012). Cooperación oncogénica entre la citoquina pro-inflamatoria SP y el receptor tirosina quinasa ErbB-2/HER2, Universidad de Barcelona.
- García-López, M. J., J. M. Martínez-Martos, M. D. Mayas, M. P. Carrera and M. J. Ramírez- Expósito (2002). "[Physiology of the neuropeptides]." *Rev Neurol* **35**(8): 784-793.
- Geneser, F. (1985). Color atlas of histology. Copenhagen, Munksgaard.
- Gerard, N. P., L. A. Garraway, R. L. Eddy, T. B. Shows, H. Iijima, J. L. Paquet and C. Gerard (1991). "Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones." *Biochemistry* **30**(44): 10640-10646.
- Gether, U., T. E. Johansen, R. M. Snider, J. A. Lowe, S. Nakanishi and T. W. Schwartz (1993). "Different binding epitopes on the NK1 receptor for substance P and non-peptide antagonist." *Nature* **362**(6418): 345-348.
- Gillberg, P. G., S. M. Aquilonius, S. A. Eckernäs, G. Lundqvist and B. Winblad (1982). "Choline acetyltransferase and substance P-like immuno-reactivity in the human spinal cord: changes in amyotrophic lateral sclerosis." *Brain Res* **250**(2): 394-397.
- Gillespie, E., S. E. Leeman, L. A. Watts, J. A. Coukos, M. J. O'Brien, S. R. Cerda, F. A. Farraye and A. F. Stucchi (2013). "Plasminogen activator inhibitor-1 is increased in colonic epithelial cells from patients with colitis-associated cancer." *J Crohns Colitis* **7**(5): 403-411.
- Gitter, B. D., D. Regoli, J. J. Howbert, A. L. Glasebrook and D. C. Waters (1994). "Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P." *J Neuroimmunol* **51**(1): 101-108.
- González Moles, M. A., F. Esteban, I. Ruiz-Avila, J. A. Gil Montoya, S. Brener, A. Bascones-Martínez and M. Muñoz (2009). "A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation and apoptosis in oral lichen planus." *Oral Dis* **15**(2): 162-169.
- Grady, E. F., A. M. Garland, P. D. Gamp, M. Lovett, D. G. Payan and N. W. Bunnett (1995). "Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor." *Mol Biol Cell* **6**(5): 509-524.
- Granger, C. B. and T. J. Povsic (2014). "Another biomarker for risk assessment in acute myocardial infarction?" *J Am Coll Cardiol* **64**(16): 1708-1710.
- Greco, S. J., K. E. Corcoran, K. J. Cho and P. Rameshwar (2004). "Tachykinins in the emerging immune system: relevance to bone marrow homeostasis and maintenance of hematopoietic stem cells." *Front Biosci* **9**: 1782-1793.

- Guard, S. and S. P. Watson (1991). "Tachykinin receptor types: Classification and membrane signalling mechanisms." *Neurochem Int* **18**(2): 149-165.
- Guindo Soldevilla, J. (2004). *Apuntes de cardiología*.
- Habets, P. E., A. F. Moorman, D. E. Clout, M. A. van Roon, M. Lingbeek, M. van Lohuizen, M. Campione and V. M. Christoffels (2002). "Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation." *Genes Dev* **16**(10): 1234-1246.
- Hall, J. E. and A. C. Guyton (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier.
- Han, P., J. Bloomekatz, J. Ren, R. Zhang, J. D. Grinstein, L. Zhao, C. G. Burns, C. E. Burns, R. M. Anderson and N. C. Chi (2016). "Coordinating cardiomyocyte interactions to direct ventricular chamber morphogenesis." *Nature* **534**(7609): 700-704.
- Hauser-Kronberger, C., G. W. Hacker, W. Muss, A. Saria and K. Albegger (1993). "Autonomic and peptidergic innervation of human nasal mucosa." *Acta Otolaryngol* **113**(3): 387-393.
- Hennig, I. M., J. A. Laissue, U. Horisberger and J. C. Reubi (1995). "Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization." *Int J Cancer* **61**(6): 786-792.
- Hill, R. (2000). "NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans?" *Trends Pharmacol Sci* **21**(7): 244-246.
- Ho, W. Z. and S. D. Douglas (2004). "Substance P and neurokinin-1 receptor modulation of HIV." *J Neuroimmunol* **157**(1-2): 48-55.
- Hokfelt, T., B. Pernow and J. Wahren (2001). "Substance P: a pioneer amongst neuropeptides." *J Intern Med* **249**(1): 27-40.
- Holmgren, S. and J. Jensen (2001). "Evolution of vertebrate neuropeptides." *Brain Res Bull* **55**(6): 723-735.
- Holzer, P., A. Bucsics and F. Lembeck (1982). "Distribution of capsaicin-sensitive nerve fibres containing immunoreactive substance P in cutaneous and visceral tissues of the rat." *Neurosci Lett* **31**(3): 253-257.
- Hoogaars, W. M., A. Tessari, A. F. Moorman, P. A. de Boer, J. Hagoort, A. T. Soufan, M. Campione and V. M. Christoffels (2004). "The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart." *Cardiovasc Res* **62**(3): 489-499.
- Hoover, D. B. (1990). "Effects of substance P on rate and perfusion pressure in the isolated guinea pig heart." *J Pharmacol Exp Ther* **252**(1): 179-184.
- Hoover, D. B., Y. Chang, J. C. Hancock and L. Zhang (2000). "Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease." *Jpn J Pharmacol* **84**(4): 367-373.
- Hoover, D. B. and J. C. Hancock (1988). "Distribution of substance P binding sites in guinea-pig heart and pharmacological effects of substance P." *J Auton Nerv Syst* **23**(3): 189-197.
- Hoover, D. B., E. R. Isaacs, F. Jacques, J. L. Hoard, P. Pagé and J. A. Armour (2009). "Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia." *Neuroscience* **164**(3): 1170-1179.
- Hoover, D. B., A. V. Shepherd, E. M. Southerland, J. A. Armour and J. L. Ardell (2008). "Neurochemical diversity of afferent neurons that transduce sensory signals from dog ventricular myocardium." *Auton Neurosci* **141**(1-2): 38-45.

- Hopkins, B., S. J. Powell, P. Danks, I. Briggs and A. Graham (1992). "Isolation and characterisation of the human lung NK-1 receptor cDNA." Biochem Biophys Res Commun **182**(3): 1514.
- Horackova, M., J. A. Armour, D. A. Hopkins and M. H. Huang (1995). "Nitric oxide modulates signaling between cultured adult peripheral cardiac neurons and cardiomyocytes." Am J Physiol **269**(2 Pt 1): C504-510.
- Horackova, M., M. H. Huang and J. A. Armour (1994). "Purinergetic modulation of adult guinea pig cardiomyocytes in long term cultures and co-cultures with extracardiac or intrinsic cardiac neurones." Cardiovasc Res **28**(5): 673-679.
- Hougland, M. W. and D. B. Hoover (1983). "Detection of substance P-like immunoreactivity in nerve fibers in the heart of guinea-pigs but not rats." J Auton Nerv Syst **8**(3): 295-301.
- Hu, G., M. He, W. K. Ko, C. Lin and A. O. Wong (2014). "Novel Pituitary Actions of TAC3 Gene Products in Fish Model: - Receptor Specificity and Signal Transduction for Prolactin and Somatolactin α Regulation by Neurokinin B (NKB) and NKB- Related Peptide in Carp Pituitary Cells." Endocrinology: en20141105.
- Hua, F., B. A. Ricketts, A. Reifsteck, J. L. Ardell and C. A. Williams (2004). "Myocardial ischemia induces the release of substance P from cardiac afferent neurons in rat thoracic spinal cord." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(5): H1654-1664.
- Huang, M. H., J. J. Bahl, Y. Wu, F. Hu, D. F. Larson, W. R. Roeske and G. A. Ewy (2005). "Neuroendocrine properties of intrinsic cardiac adrenergic cells in fetal rat heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(2): H497-503.
- Huang, M. H., D. S. Friend, M. E. Sunday, K. Singh, K. Haley, K. F. Austen, R. A. Kelly and T. W. Smith (1996). "An intrinsic adrenergic system in mammalian heart." J Clin Invest **98**(6): 1298-1303.
- Hökfelt, T., C. Broberger, Z. Q. Xu, V. Sergeev, R. Ubink and M. Diez (2000). "Neuropeptides--an overview." Neuropharmacology **39**(8): 1337-1356.
- Hökfelt, T., V. R. Holets, W. Staines, B. Meister, T. Melander, M. Schalling, M. Schultzberg, J. Freedman, H. Björklund and L. Olson (1986). "Coexistence of neuronal messengers--an overview." Prog Brain Res **68**: 33-70.
- Hökfelt, T., O. Johansson, A. Ljungdahl, J. M. Lundberg and M. Schultzberg (1980). "Peptidergic neurones." Nature **284**(5756): 515-521.
- Hökfelt, T., J. M. Lundberg, M. Schultzberg, O. Johansson, L. Skirboll, A. Anggård, B. Fredholm, B. Hamberger, B. Pernow, J. Rehfeld and M. Goldstein (1980). "Cellular localization of peptides in neural structures." Proc R Soc Lond B Biol Sci **210**(1178): 63-77.
- Hökfelt, T., D. Millhorn, K. Seroogy, Y. Tsuruo, S. Ceccatelli, B. Lindh, B. Meister, T. Melander, M. Schalling and T. Bartfai (1987). "Coexistence of peptides with classical neurotransmitters." Experientia **43**(7): 768-780.
- Hökfelt, T., S. Vincent, C. J. Dalsgaard, L. Skirboll, O. Johansson, M. Schultzberg, J. M. Lundberg, S. Rosell, B. Pernow and G. Jancsó (1982). "Distribution of substance P in brain and periphery and its possible role as a co-transmitter." Ciba Found Symp(91): 84-106.
- Iversen, S., Iversen, L. & Saper, C. B (2001). Sistema nervioso autónomo e hipotálamo. Principios de Neurociencia, McGraw-Hill.

- Izrailtyan, I. and J. Y. Kresh (1997). "Bradykinin modulation of isolated rabbit heart function is mediated by intrinsic cardiac neurons." Cardiovasc Res **33**(3): 641-649.
- Johansson, O., T. Hökfelt, B. Pernow, S. L. Jeffcoate, N. White, H. W. Steinbusch, A. A. Verhofstad, P. C. Emson and E. Spindel (1981). "Immunohistochemical support for three putative transmitters in one neuron: coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P- and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord." Neuroscience **6**(10): 1857-1881.
- Jones, S., K. L. Tucker, T. Sage, W. J. Kaiser, N. E. Barrett, P. J. Lowry, A. Zimmer, S. P. Hunt, M. Emerson and J. M. Gibbins (2008). "Peripheral tachykinins and the neurokinin receptor NK1 are required for platelet thrombus formation." Blood **111**(2): 605-612.
- Joos, G. F., K. O. De Swert, V. Schelfhout and R. A. Pauwels (2003). "The role of neural inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Ann N Y Acad Sci **992**: 218-230.
- Jorgensen, R., N. D. Holliday, J. L. Hansen, M. Vrecl, A. Heding, T. W. Schwartz and C. E. Elling (2008). "Characterization of G-protein coupled receptor kinase interaction with the neurokinin-1 receptor using bioluminescence resonance energy transfer." Mol Pharmacol **73**(2): 349-358.
- Jotwani, G., K. Itoh and S. Wadhwa (1994). "Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase, substance P, neuropeptide-Y and leucine-enkephalin in developing human retinal amacrine cells." Brain Res Dev Brain Res **77**(2): 285-289.
- Kage, R., G. P. McGregor, L. Thim and J. M. Conlon (1988). "Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin." J Neurochem **50**(5): 1412-1417.
- Kandel, E. R. (2013). Principles of neural science. New York, McGraw-Hill Medical.
- Kandel, E. R. e., J. H. e. Schwartz, T. M. e. Jessell, S. e. Siegelbaum and A. J. e. Hudspeth (2000). Principles of neural science.
- Kang, B. N., K. S. Jeong, S. J. Park, S. J. Kim, T. H. Kim, H. J. Kim and S. Y. Ryu (2001). "Regulation of apoptosis by somatostatin and substance P in peritoneal macrophages." Regul Pept **101**(1-3): 43-49.
- Kang, H. S., K. A. Trzaska, K. Corcoran, V. T. Chang and P. Rameshwar (2004). "Neurokinin receptors: relevance to the emerging immune system." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **52**(5): 338-347.
- Kangawa, K., N. Minamino, A. Fukuda and H. Matsuo (1983). "Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord." Biochem Biophys Res Commun **114**(2): 533-540.
- Kast, R. E., S. Ramiro, S. Lladó, S. Toro, R. Coveñas and M. Muñoz (2016). "Antitumor action of temozolomide, ritonavir and aprepitant against human glioma cells." J Neurooncol **126**(3): 425-431.
- Kavelaars, A., F. Jeurissen and C. J. Heijnen (1994). "Substance P receptors and signal transduction in leukocytes." Immunomethods **5**(1): 41-48.
- Kawano, H., R. Okada and K. Yano (2003). "Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart." Heart Vessels **18**(1): 32-39.

- Kawashima, T. (2005). "The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution." Anat Embryol (Berl) **209**(6): 425-438.
- Kerdelhué, B., V. Lenoir, R. Scholler and H. W. Jones (2006). "Substance P plasma concentration during the LH preovulatory surge of the menstrual cycle in the human." Neuro Endocrinol Lett **27**(3): 359-364.
- Kerdelhué, B., R. F. Williams, V. Lenoir, V. Fardin, P. Kolm, G. D. Hodgen, G. S. Jones, R. Scholler and H. W. Jones (2000). "Variations in plasma levels of substance P and effects of a specific substance P antagonist of the NK(1) receptor on preovulatory LH and FSH surges and progesterone secretion in the cycling cynomolgus monkey." Neuroendocrinology **71**(4): 228-236.
- KIMURA, S., M. OKADA, Y. SUGITA, I. KANAZAWA and E. MUNEKATA (1983). "Novel neuropeptides, neurokinin. ALPHA. and. BETA., isolated from porcine spinal cord." Proceedings of the Japan Academy. Ser. B: Physical and Biological Sciences **59**(4): 101-104.
- Kirby, M. L. and K. L. Waldo (1990). "Role of neural crest in congenital heart disease." Circulation **82**(2): 332-340.
- Kotani, H., M. Hoshimaru, H. Nawa and S. Nakanishi (1986). "Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(18): 7074-7078.
- Kramer (1942). "The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the interventricular septum in the human heart." Am J Anat.
- Kramer, M. S., N. Cutler, J. Feighner, R. Shrivastava, J. Carman, J. J. Sramek, S. A. Reines, G. Liu, D. Snavely, E. Wyatt-Knowles, J. J. Hale, S. G. Mills, M. MacCoss, C. J. Swain, T. Harrison, R. G. Hill, F. Hefti, E. M. Scolnick, M. A. Cascieri, G. G. Chicchi, S. Sadowski, A. R. Williams, L. Hewson, D. Smith, E. J. Carlson, R. J. Hargreaves and N. M. Rupniak (1998). "Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors." Science **281**(5383): 1640-1645.
- Kramer, M. S., A. Winokur, J. Kelsey, S. H. Preskorn, A. J. Rothschild, D. Snavely, K. Ghosh, W. A. Ball, S. A. Reines, D. Munjack, J. T. Apter, L. Cunningham, M. Kling, M. Bari, A. Getson and Y. Lee (2004). "Demonstration of the efficacy and safety of a novel substance P (NK1) receptor antagonist in major depression." Neuropsychopharmacology **29**(2): 385-392.
- Krause, J. E., Y. Takeda and A. D. Hershey (1992). "Structure, functions, and mechanisms of substance P receptor action." J Invest Dermatol **98**(6 Suppl): 2S-7S.
- Krieger, D. T. (1986). "An overview of neuropeptides." Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis **64**: 1-32.
- Kuramoto, H., Y. Oomori, H. Murabayashi, M. Kadowaki, S. Karaki and A. Kuwahara (2004). "Localization of neurokinin 1 receptor (NK1R) immunoreactivity in rat esophagus." J Comp Neurol **478**(1): 11-21.
- Kurtz, M. M., R. Wang, M. K. Clements, M. A. Cascieri, C. P. Austin, B. R. Cunningham, G. G. Chicchi and Q. Liu (2002). "Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides." Gene **296**(1-2): 205-212.
- Kwako, L. E., D. T. George, M. L. Schwandt, P. A. Spagnolo, R. Momenan, D. W. Hommer, C. A. Diamond, R. Sinha, Y. Shaham and M. Heilig (2014). "The

- neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant in co-morbid alcohol dependence and posttraumatic stress disorder: a human experimental study." Psychopharmacology (Berl).
- Lai, J. P., S. Lai, F. Tuluc, M. F. Tansky, L. E. Kilpatrick, S. E. Leeman and S. D. Douglas (2008). "Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12605-12610.
 - Laine, P., A. Naukkarinen, L. Heikkilä, A. Penttilä and P. T. Kovanen (2000). "Adventitial mast cells connect with sensory nerve fibers in atherosclerotic coronary arteries." Circulation **101**(14): 1665-1669.
 - Lang, K., T. L. Drell, A. Lindecke, B. Niggemann, C. Kaltschmidt, K. S. Zaenker and F. Entschladen (2004). "Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs." Int J Cancer **112**(2): 231-238.
 - Leander, S., R. Håkanson, S. Rosell, K. Folkers, F. Sundler and K. Tornqvist (1981). "A specific substance P antagonist blocks smooth muscle contractions induced by non-cholinergic, non-adrenergic nerve stimulation." Nature **294**(5840): 467-469.
 - LEMBECK, F. (1953). "[Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord]." Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol **219**(3): 197-213.
 - Lembeck, F. and P. Holzer (1979). "Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **310**(2): 175-183.
 - Levy, M. N., A. J. Pappano and R. M. C. p. Berne (2007). Cardiovascular physiology. Edinburgh, Elsevier Mosby.
 - *Ley 14/2007, d. d. j., de Investigación biomédica*. (2007). B. O. d. Estado.
 - *Ley 41/2002, d. d. n., básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica* (2002). B. O. d. Estado.
 - *Ley Orgánica 15/1999* (1999). de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. B. O. d. Estado.
 - Li, L., J. T. Hatcher, D. B. Hoover, H. Gu, R. D. Wurster and Z. J. Cheng (2014). "Distribution and morphology of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactive axons in the whole-mount atria of mice." Auton Neurosci **181**: 37-48.
 - Li, Y., S. D. Douglas and W. Ho (2000). "Human stem cells express substance P gene and its receptor." J Hematother Stem Cell Res **9**(4): 445-452.
 - Lighvani, S., X. Huang, P. P. Trivedi, R. H. Swanborg and L. D. Hazlett (2005). "Substance P regulates natural killer cell interferon-gamma production and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection." Eur J Immunol **35**(5): 1567-1575.
 - Lindsey Allan, A. C., Ian Huggon. (2010). Ecocardiografía fetal. Una guía práctica, Ediciones Journal S.A.
 - Liu, H., Y. Cao, A. I. Basbaum, A. M. Mazarati, R. Sankar and C. G. Wasterlain (1999). "Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 12096-12101.

- Liu, H., A. M. Mazarati, H. Katsumori, R. Sankar and C. G. Wasterlain (1999). "Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5286-5291.
- Liu, K., M. D. Castillo, R. G. Murthy, N. Patel and P. Rameshwar (2007). "Tachykinins and hematopoiesis." Clin Chim Acta **385**(1-2): 28-34.
- Loewi, O. (1921). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I.Mitteilung, Pflügers Arch Ges Physiol. **189**: 239-242.
- Loewi, O. (1953). From the workshop of discoveries. Lawrence,, Univ. of Kansas Press.
- Longmore, J., R. G. Hill and R. J. Hargreaves (1997). "Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs." Can J Physiol Pharmacol **75**(6): 612-621.
- Lorenzen, S., S. Spörl and F. Lordick (2014). "[Incidence and treatment of chemotherapy-induced nausea and emesis in gastrointestinal cancer]." Z Gastroenterol **52**(8): 821-830.
- Lotz, M., D. A. Carson and J. H. Vaughan (1987). "Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis." Science **235**(4791): 893-895.
- Lotz, M., J. H. Vaughan and D. A. Carson (1988). "Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes." Science **241**(4870): 1218-1221.
- Lundberg, J. M., A. Franco-Cereceda, X. Hua, T. Hökfelt and J. A. Fischer (1985). "Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin." Eur J Pharmacol **108**(3): 315-319.
- Lundberg, J. M., A. Franco-Cereceda, J. S. Lacroix and J. Pernow (1990). "Neuropeptide Y and sympathetic neurotransmission." Ann N Y Acad Sci **611**: 166-174.
- Luo, W., T. R. Sharif and M. Sharif (1996). "Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway." Cancer Res **56**(21): 4983-4991.
- Lynch, D. R. and S. H. Snyder (1986). "Neuropeptides: multiple molecular forms, metabolic pathways, and receptors." Annu Rev Biochem **55**: 773-799.
- MacLeod, A. M., M. A. Cascieri, K. J. Merchant, S. Sadowski, S. Hardwicke, R. T. Lewis, D. E. MacIntyre, J. M. Metzger, T. M. Fong and S. Shephard (1995). "Synthesis and biological evaluation of NK1 antagonists derived from L-tryptophan." J Med Chem **38**(6): 934-941.
- Maggi, C. A. (1995). "The mammalian tachykinin receptors." Gen Pharmacol **26**(5): 911-944.
- Maggi, C. A. (1997). "The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells." Regul Pept **70**(2-3): 75-90.
- Maggio, J. E. (1988). "Tachykinins." Annu Rev Neurosci **11**: 13-28.
- Manak, M. M., D. A. Moshkoff, L. T. Nguyen, J. Meshki, P. Tebas, F. Tuluc and S. D. Douglas (2010). "Anti-HIV-1 activity of the neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and synergistic interactions with other antiretrovirals." AIDS **24**(18): 2789-2796.

- Mantyh, P. W., E. DeMaster, A. Malhotra, J. R. Ghilardi, S. D. Rogers, C. R. Mantyh, H. Liu, A. I. Basbaum, S. R. Vigna and J. E. Maggio (1995). "Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation." *Science* **268**(5217): 1629-1632.
- Mantyh, P. W., S. P. Hunt and J. E. Maggio (1984). "Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand." *Brain Res* **307**(1-2): 147-165.
- Marron, K., J. Wharton, M. N. Sheppard, D. Fagan, D. Royston, D. M. Kuhn, M. R. de Leval, B. F. Whitehead, R. H. Anderson and J. M. Polak (1995). "Distribution, morphology, and neurochemistry of endocardial and epicardial nerve terminal arborizations in the human heart." *Circulation* **92**(8): 2343-2351.
- Martin, F. C., A. C. Charles, M. J. Sanderson and J. E. Merrill (1992). "Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium." *Brain Res* **599**(1): 13-18.
- Marzioni, D., G. Fiore, A. Giordano, M. Nabissi, P. Florio, F. Verdenelli, F. Petraglia and M. Castellucci (2005). "Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(4): 2378-2383.
- Masu, Y., K. Nakayama, H. Tamaki, Y. Harada, M. Kuno and S. Nakanishi (1987). "cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system." *Nature* **329**(6142): 836-838.
- Medrano, S., E. Gruenstein and R. V. Dimlich (1994). "Substance P receptors on human astrocytoma cells are linked to glycogen breakdown." *Neurosci Lett* **167**(1-2): 14-18.
- Meshki, J., S. D. Douglas, J. P. Lai, L. Schwartz, L. E. Kilpatrick and F. Tuluc (2009). "Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinase-dependent mechanism." *J Biol Chem* **284**(14): 9280-9289.
- Milner, P., V. Ralevic, A. M. Hopwood, E. Fehér, J. Lincoln, K. A. Kirkpatrick and G. Burnstock (1989). "Ultrastructural localisation of substance P and choline acetyltransferase in endothelial cells of rat coronary artery and release of substance P and acetylcholine during hypoxia." *Experientia* **45**(2): 121-125.
- Moore Keith, P. T., Torchia M. (2009). *Embriología clínica*, Elseiver, España.
- Munoz, M. and R. Covenas (2014). "Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology." *Amino Acids* **46**(7): 1727-1750.
- Munoz, M., R. Covenas, F. Esteban and M. Redondo (2015). "The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs." *J Biosci* **40**(2): 441-463.
- Munoz, M., M. Rosso and R. Covenas (2011). "The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy." *Curr Drug Targets* **12**(6): 909-921.
- Murillo, M., J. Cabrera, G. Pizarro and D. Sánchez-Quintana (2011). Anatomía del tejido especializado de conducción cardiaco. Su interés en la cardiología intervencionista, Revista Iberoamericana de arritmología.
- Muñoz, M., J. Bernabeu-Wittel and R. Coveñas (2011). "NK-1 as a melanoma target." *Expert Opin Ther Targets* **15**(7): 889-897.
- Muñoz, M. and R. Coveñas (2011). "NK-1 receptor antagonists: a new paradigm in pharmacological therapy." *Curr Med Chem* **18**(12): 1820-1831.

- Muñoz, M. and R. Coveñas (2013). "Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer progression." *Peptides* **48**: 1-9.
- Muñoz, M. and R. Coveñas (2015). "Targeting NK-1 Receptors to Prevent and Treat Pancreatic Cancer: a New Therapeutic Approach." *Cancers (Basel)* **7**(3): 1215-1232.
- Muñoz, M. and R. Coveñas (2016). "Neurokinin-1 receptor antagonists as antitumor drugs in gastrointestinal cancer: A new approach." *Saudi J Gastroenterol* **22**(4): 260-268.
- Muñoz, M., A. González-Ortega and R. Coveñas (2012). "The NK-1 receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1 receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines." *Invest New Drugs* **30**(2): 529-540.
- Muñoz, M., A. González-Ortega, M. Rosso, M. J. Robles-Frias, A. Carranza, M. V. Salinas-Martín and R. Coveñas (2012). "The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists." *Peptides* **38**(2): 318-325.
- Muñoz, M., A. Pavón, M. Rosso, M. V. Salinas, A. Pérez, A. Carranza and A. González-Ortega (2010). "Immunolocalization of NK-1 receptor and Substance P in human normal placenta." *Placenta* **31**(7): 649-651.
- Muñoz, M., A. Pérez, R. Coveñas, M. Rosso and E. Castro (2004). "Antitumoural action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines." *Arch Ital Biol* **142**(2): 105-112.
- Muñoz, M., M. Rosso, F. J. Aguilar, M. A. González-Moles, M. Redondo and F. Esteban (2008). "NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEP-2." *Invest New Drugs* **26**(2): 111-118.
- Muñoz, M., M. Rosso, R. Coveñas, I. Montero, M. A. González-Moles and M. J. Robles (2007). "Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines: antitumor action of its antagonist, L-732,138." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(6): 2775-2781.
- Muñoz, M., M. Rosso, A. Pérez, R. Coveñas, R. Rosso, C. Zamarriego and J. I. Piruat (2005). "The NK1 receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines." *Neuropeptides* **39**(4): 427-432.
- Muñoz M, Covenas R, Esteban F, Redondo M (2015). The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *Journal of biosciences*. **40**(2):441-63
- Müller-Sieburg, C. E. and E. Deryugina (1995). "The stromal cells' guide to the stem cell universe." *Stem Cells* **13**(5): 477-486.
- Nakagawa, N., H. Sano and I. Iwamoto (1995). "Substance P induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 on vascular endothelial cells and enhances neutrophil transendothelial migration." *Peptides* **16**(4): 721-725.
- Navari, R. M. (2007). "Fosaprepitant (MK-0517): a neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting." *Expert Opin Investig Drugs* **16**(12): 1977-1985.
- Nawa, H., T. Hirose, H. Takashima, S. Inayama and S. Nakanishi (1983). "Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor." *Nature* **306**(5938): 32-36.

- Nelson, D. A., I. Marriott and K. L. Bost (2004). "Expression of hemokinin 1 mRNA by murine dendritic cells." *J Neuroimmunol* **155**(1-2): 94-102.
- Netter, F. (2011). *Atlas de anatomía humana*, Editorial Masson.
- Ng, L. L., J. K. Sandhu, H. Narayan, P. A. Quinn, I. B. Squire, J. E. Davies, J. Struck, A. Bergmann, A. Maisel and D. J. Jones (2014). "Pro-substance p for evaluation of risk in acute myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* **64**(16): 1698-1707.
- Nilsson, G., Dahlberg, K., Brodin, E. (1977). Distribution and constrictor effect of substance P in guinea pig tracheobronchial tissues. *Substance P*. V. E. B. Pernow. New York, Raven Press: 75-81.
- Nilsson, J., A. M. von Euler and C. J. Dalsgaard (1985). "Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K." *Nature* **315**(6014): 61-63.
- O'Connell, P. J., S. C. Pingle and G. P. Ahern (2005). "Dendritic cells do not transduce inflammatory stimuli via the capsaicin receptor TRPV1." *FEBS Lett* **579**(23): 5135-5139.
- O'Connor, T. M., J. O'Connell, D. I. O'Brien, T. Goode, C. P. Bredin and F. Shanahan (2004). "The role of substance P in inflammatory disease." *J Cell Physiol* **201**(2): 167-180.
- O'Shaughnessy, D. J., G. P. McGregor, M. A. Ghatei, M. A. Blank, D. R. Springall, J. Gu, J. M. Polak and S. R. Bloom (1983). "Distribution of bombesin, somatostatin, substance-P and vasoactive intestinal polypeptide in feline and porcine skin." *Life Sci* **32**(25): 2827-2836.
- Ohkubo, H. and S. Nakanishi (1991). "Molecular characterization of the three tachykinin receptors." *Ann N Y Acad Sci* **632**: 53-62.
- Ohta, H. and W. T. Talman (1994). "Both NMDA and non-NMDA receptors in the NTS participate in the baroreceptor reflex in rats." *Am J Physiol* **267**(4 Pt 2): R1065-1070.
- Onuoha, G. N., E. K. Alpar, R. Chukwulobelu and D. P. Nicholls (1999). "Distributions of VIP, substance P, neurokinin A and neurotensin in rat heart: an immunocytochemical study." *Neuropeptides* **33**(1): 19-25.
- Organist, M. L., J. P. Harvey, J. P. McGillis and D. G. Payan (1988). "Processing of the human IM-9 lymphoblast substance P receptor. Biosynthetic and degradation studies using a monoclonal anti-receptor antibody." *Biochem Biophys Res Commun* **151**(1): 535-541.
- Orrego, F. (1979). "Criteria for the identification of central neurotransmitters, and their application to studies with some nerve tissue preparations in vitro." *Neuroscience* **4**(8): 1037-1057.
- Otsuka, M. and K. Yoshioka (1993). "Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins." *Physiol Rev* **73**(2): 229-308.
- Page, N. M. (2004). "Hemokinins and endokinins." *Cell Mol Life Sci* **61**(13): 1652-1663.
- Page, N. M. (2005). "New challenges in the study of the mammalian tachykinins." *Peptides* **26**(8): 1356-1368.
- Page, N. M. (2006). "Characterization of the gene structures, precursor processing and pharmacology of the endokinin peptides." *Vascul Pharmacol* **45**(4): 200-208.
- Page, N. M. (2010). "Neurokinin B and pre-eclampsia: a decade of discovery." *Reprod Biol Endocrinol* **8**: 4.

- Page, N. M., N. J. Bell, S. M. Gardiner, I. T. Manyonda, K. J. Brayley, P. G. Strange and P. J. Lowry (2003). "Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 6245-6250.
- Page, N. M., C. F. Kemp, D. J. Butlin and P. J. Lowry (2002). "Placental peptides as markers of gestational disease." *Reproduction* **123**(4): 487-495.
- Page, N. M., D. W. Morrish and N. J. Weston-Bell (2009). "Differential mRNA splicing and precursor processing of neurokinin B in neuroendocrine tissues." *Peptides* **30**(8): 1508-1513.
- Palanche, T., B. Ilien, S. Zoffmann, M. P. Reck, B. Bucher, S. J. Edelstein and J. L. Galzi (2001). "The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states." *J Biol Chem* **276**(37): 34853-34861.
- Palma, C. (2006). "Tachykinins and their receptors in human malignancies." *Curr Drug Targets* **7**(8): 1043-1052.
- Palma, C., M. Bigioni, C. Irrissuto, F. Nardelli, C. A. Maggi and S. Manzini (2000). "Anti-tumour activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft." *Br J Cancer* **82**(2): 480-487.
- Pantaleo, N., W. Chadwick, S. S. Park, L. Wang, Y. Zhou, B. Martin and S. Maudsley (2010). "The mammalian tachykinin ligand-receptor system: an emerging target for central neurological disorders." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **9**(5): 627-635.
- Papka, R. E. and L. Urban (1987). "Distribution, origin and sensitivity to capsaicin of primary afferent substance P-immunoreactive nerves in the heart." *Acta Physiol Hung* **69**(3-4): 459-468.
- Parenti, C., G. Aricò, G. Ronsisvalle and G. M. Scoto (2012). "Supraspinal injection of Substance P attenuates allodynia and hyperalgesia in a rat model of inflammatory pain." *Peptides* **34**(2): 412-418.
- Park, S. W., Y. P. Yan, I. Satriotomo, R. Vemuganti and R. J. Dempsey (2007). "Substance P is a promoter of adult neural progenitor cell proliferation under normal and ischemic conditions." *J Neurosurg* **107**(3): 593-599.
- Patacchini, R., A. Lecci, P. Holzer and C. A. Maggi (2004). "Newly discovered tachykinins raise new questions about their peripheral roles and the tachykinin nomenclature." *Trends Pharmacol Sci* **25**(1): 1-3.
- Patak, E., F. M. Pinto, M. E. Story, C. O. Pintado, A. Fleming, N. M. Page, J. N. Pennefather and M. L. Candenas (2005). "Functional and molecular characterization of tachykinins and tachykinin receptors in the mouse uterus." *Biol Reprod* **72**(5): 1125-1133.
- Payan, D. G., D. R. Brewster and E. J. Goetzl (1983). "Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P." *J Immunol* **131**(4): 1613-1615.
- Pelletier, G., H. W. Steinbusch and A. A. Verhofstad (1981). "Immunoreactive substance P and serotonin present in the same dense-core vesicles." *Nature* **293**(5827): 71-72.
- Pennefather, J. N., A. Lecci, M. L. Candenas, E. Patak, F. M. Pinto and C. A. Maggi (2004). "Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family." *Life Sci* **74**(12): 1445-1463.
- Pennefather, J. N., X. P. Zeng, D. Gould, S. Hall and E. Burcher (1993). "Mammalian tachykinins stimulate rat uterus by activating NK-2 receptors." *Peptides* **14**(2): 169-174.

- Pernow, B. (1953). "Studies on substance P; purification, occurrence and biological actions." *Acta Physiol Scand Suppl* **29**(105): 1-89.
- Pernow, B. (1963). "Pharmacology of substance P." *Ann N Y Acad Sci* **104**: 393-402.
- Pernow, B. (1983). "Substance P." *Pharmacol Rev* **35**(2): 85-141.
- Pernow, B. (1985). "Role of tachykinins in neurogenic inflammation." *J Immunol* **135**(2 Suppl): 812s-815s.
- Piedimonte, G., C. Bertrand, P. Geppetti, R. M. Snider, M. C. Desai and J. A. Nadel (1993). "A new NK1 receptor antagonist (CP-99,994) prevents the increase in tracheal vascular permeability produced by hypertonic saline." *J Pharmacol Exp Ther* **266**(1): 270-273.
- Pintado, C. O., F. M. Pinto, J. N. Pennefather, A. Hidalgo, A. Baamonde, T. Sanchez and M. L. Candenás (2003). "A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function." *Biol Reprod* **69**(3): 940-946.
- Pinto, F. M., T. A. Almeida, M. Hernandez, P. Devillier, C. Advenier and M. L. Candenás (2004). "mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues." *Eur J Pharmacol* **494**(2-3): 233-239.
- Quartara, L. and C. A. Maggi (1998). "The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles." *Neuropeptides* **32**(1): 1-49.
- Rameshwar, P., D. Ganea and P. Gascón (1993). "In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis." *Blood* **81**(2): 391-398.
- *Real Decreto 1716/2011* (2011). *de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica*. B. O. d. Estado.
- Reed-Hagen, A. E., M. Tsuchiya, K. Shimada, J. A. Wentland and R. S. Obach (1999). "Pharmacokinetics of ezlopitant, a novel non-peptidic neurokinin-1 receptor antagonist in preclinical species and metabolite kinetics of the pharmacologically active metabolites." *Biopharm Drug Dispos* **20**(9): 429-439.
- Reichelt, K. L. and P. D. Edminson (1976). "Transmitter-dependent peptide synthesis in the central nervous system." *Adv Biochem Psychopharmacol* **15**: 211-223.
- Reinecke, M., E. Weihe and W. G. Forssmann (1980). "Substance P-immunoreactive nerve fibers in the heart." *Neurosci Lett* **20**(3): 265-269.
- Reinke, E. and Z. Fabry (2006). "Breaking or making immunological privilege in the central nervous system: the regulation of immunity by neuropeptides." *Immunol Lett* **104**(1-2): 102-109.
- Reinke, E. K., M. J. Johnson, C. Ling, J. Karman, J. Lee, J. V. Weinstock, M. Sandor and Z. Fabry (2006). "Substance P receptor mediated maintenance of chronic inflammation in EAE." *J Neuroimmunol* **180**(1-2): 117-125.
- Reiter, E. and R. J. Lefkowitz (2006). "GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling." *Trends Endocrinol Metab* **17**(4): 159-165.
- Reubi, J. C., L. Mazzucchelli, I. Hennig and J. A. Laissue (1996). "Local up-regulation of neuropeptide receptors in host blood vessels around human colorectal cancers." *Gastroenterology* **110**(6): 1719-1726.

- Richfield, E. K., J. P. Vonsattel, M. E. MacDonald, Z. Sun, Y. P. Deng and A. Reiner (2002). "Selective loss of striatal preprotachykinin neurons in a phenocopy of Huntington's disease." *Mov Disord* **17**(2): 327-332.
- Rimón, R., P. Le Grevés, F. Nyberg, L. Heikkilä, L. Salmela and L. Terenius (1984). "Elevation of substance P-like peptides in the CSF of psychiatric patients." *Biol Psychiatry* **19**(4): 509-516.
- Robinson, P., A. Garza, J. Moore, T. K. Eckols, S. Parti, V. Balaji, J. Vallejo and D. J. Tweardy (2009). "Substance P is required for the pathogenesis of EMCV infection in mice." *Int J Clin Exp Med* **2**(1): 76-86.
- Robinson, P., G. E. Taffet, N. Engineer, M. Khumbatta, B. Firozgary, C. Reynolds, T. Pham, T. Bulsara and G. Firozgary (2015). "Substance p receptor antagonism: a potential novel treatment option for viral-myocarditis." *Biomed Res Int* **2015**: 645153.
- Roger R. Markwald, M. D. I. C. (1998). *Living Morphogenesis of the Heart Cardiovascular Molecular Morphogenesis*.
- Ross, M. (2016). *Histology. A text and atlas with correlated cell and molecular biology*.
- Ross, M. H. and W. Pawlina (2016). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Philadelphia, Wolters Kluwer Health.
- Rosso, M., M. Muñoz and M. Berger (2012). "The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer." *ScientificWorldJournal* **2012**: 381434.
- Rosso, M., M. J. Robles-Frias, R. Covenas, M. V. Salinas-Martin and M. Munoz (2008). "The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines." *Tumour Biol* **29**(4): 245-254.
- Rosso, M., M. J. Robles-Frías, R. Coveñas, M. V. Salinas-Martín and M. Muñoz (2008). "The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines." *Tumour Biol* **29**(4): 245-254.
- Russell, I. J. (2002). "The promise of substance P inhibitors in fibromyalgia." *Rheum Dis Clin North Am* **28**(2): 329-342.
- Rysevaite, K., I. Saburkina, N. Pauziene, S. F. Noujaim, J. Jalife and D. H. Pauza (2011). "Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart." *Heart Rhythm* **8**(3): 448-454.
- Rysevaite, K., I. Saburkina, N. Pauziene, R. Vaitkevicius, S. F. Noujaim, J. Jalife and D. H. Pauza (2011). "Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations." *Heart Rhythm* **8**(5): 731-738.
- Saffroy, M., Y. Torrens, J. Glowinski and J. C. Beaujouan (2001). "Presence of NK2 binding sites in the rat brain." *J Neurochem* **79**(5): 985-996.
- Santini, D., B. Vincenzi, F. M. Guida, M. Imperatori, G. Schiavon, O. Venditti, A. M. Frezza, P. Berti and G. Tonini (2012). "Aprepitant for management of severe pruritus related to biological cancer treatments: a pilot study." *Lancet Oncol* **13**(10): 1020-1024.

- Sastry, B. V., O. S. Tayeb, S. L. Barnwell, V. E. Janson and L. K. Owens (1981). "Peptides from human placenta: methionine enkephalin and substance P." *Placenta Suppl* **3**: 327-337.
- Satake, H. and T. Kawada (2006). "Overview of the primary structure, tissue-distribution, and functions of tachykinins and their receptors." *Curr Drug Targets* **7**(8): 963-974.
- Schwartz, J. H. (1985). Principles of neural science. E. R. Kandel and J. H. Schwartz. New York, El Sevier: 148-158.
- Schwartz, L., S. V. Spitsin, J. Meshki, F. Tuluc, S. D. Douglas and J. H. Wolfe (2013). "Substance P enhances HIV-1 infection in human fetal brain cell cultures expressing full-length neurokinin-1 receptor." *J Neurovirol* **19**(3): 219-227.
- Seiffert, K. and R. D. Granstein (2002). "Neuropeptides and neuroendocrine hormones in ultraviolet radiation-induced immunosuppression." *Methods* **28**(1): 97-103.
- Severini, C., G. Improta, G. Falconieri-Erspamer, S. Salvadori and V. Erspamer (2002). "The tachykinin peptide family." *Pharmacol Rev* **54**(2): 285-322.
- Shaik-Dasthagirisahab, Y. B., G. Varvara, G. Murmura, A. Saggini, G. Potalivo, A. Caraffa, P. Antinolfi, S. Tete', D. Tripodi, F. Conti, E. Cianchetti, E. Toniato, M. Rosati, P. Conti, L. Speranza, A. Pantalone, R. Saggini, T. C. Theoharides and F. Pandolfi (2013). "Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation." *Int J Immunopathol Pharmacol* **26**(2): 327-335.
- Sharkey, K. A., R. G. Williams and G. J. Dockray (1984). "Sensory substance P innervation of the stomach and pancreas. Demonstration of capsaicin-sensitive sensory neurons in the rat by combined immunohistochemistry and retrograde tracing." *Gastroenterology* **87**(4): 914-921.
- Sherrington, C. S. S. (1906). *Integrative action of the nervous system*. New Haven, Yale U.P.
- Shimizu, Y., H. Matsuyama, T. Shiina, T. Takewaki and J. B. Furness (2008). "Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract." *Cell Mol Life Sci* **65**(2): 295-311.
- Siegel, G. J. (1981). *Basic neurochemistry*. Boston, Little, Brown.
- Slavíková, J., J. Kuncová, J. Reischig and M. Dvoráková (2003). "Catecholaminergic neurons in the rat intrinsic cardiac nervous system." *Neurochem Res* **28**(3-4): 593-598.
- Snider, R. M., J. W. Constantine, J. A. Lowe, K. P. Longo, W. S. Lebel, H. A. Woody, S. E. Drozda, M. C. Desai, F. J. Vinick and R. W. Spencer (1991). "A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor." *Science* **251**(4992): 435-437.
- Sonomura, T., K. Nakamura, T. Furuta, H. Hioki, A. Nishi, A. Yamanaka, M. Uemura and T. Kaneko (2007). "Expression of D1 but not D2 dopamine receptors in striatal neurons producing neurokinin B in rats." *Eur J Neurosci* **26**(11): 3093-3103.
- Sosunov, A. A., C. J. Hassall, A. Loesch, M. Turmaine and G. Burnstock (1996). "Nitric oxide synthase-containing neurones and nerve fibres within cardiac ganglia of rat and guinea-pig: an electron-microscopic immunocytochemical study." *Cell Tissue Res* **284**(1): 19-28.
- Souza, D. G., D. C. Cara, G. D. Cassali, S. F. Coutinho, M. R. Silveira, S. P. Andrade, S. P. Poole and M. M. Teixeira (2000). "Effects of the PAF receptor antagonist

- UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat." *Br J Pharmacol* **131**(8): 1800-1808.
- Stacey E, M. (2012). *Histology for Pathologists*.
 - Steele, P. A. and J. K. Choate (1994). "Innervation of the pacemaker in guinea-pig sinoatrial node." *J Auton Nerv Syst* **47**(3): 177-187.
 - Steinhoff, M. S., B. von Mentzer, P. Geppetti, C. Pothoulakis and N. W. Bunnett (2014). "Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease." *Physiol Rev* **94**(1): 265-301.
 - Stewart-Lee, A. and G. Burnstock (1989). "Actions of tachykinins on the rabbit mesenteric artery: substance P and [Glp6,L-Pro9]SP6-11 are potent agonists for endothelial neurokinin-1 receptors." *Br J Pharmacol* **97**(4): 1218-1224.
 - Strand, F. L. (1999). *Neuropeptides: regulators of physiological processes*. Cambridge, Mass., MIT Press.
 - Takeda, Y., J. Takeda, B. M. Smart and J. E. Krause (1990). "Regional distribution of neuropeptide gamma and other tachykinin peptides derived from the substance P gene in the rat." *Regul Pept* **28**(3): 323-333.
 - Talman, W. T., M. H. Perrone and D. J. Reis (1980). "Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers." *Science* **209**(4458): 813-815.
 - Tansky, M. F., C. Pothoulakis and S. E. Leeman (2007). "Functional consequences of alteration of N-linked glycosylation sites on the neurokinin 1 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(25): 10691-10696.
 - Tatemoto, K., J. M. Lundberg, H. Jörnvall and V. Mutt (1985). "Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin." *Biochem Biophys Res Commun* **128**(2): 947-953.
 - Tay, S. S. and W. C. Wong (1992). "Immunocytochemical localisation of substance P-like nerves in the cardiac ganglia of the monkey (*Macaca fascicularis*)." *J Anat* **180 (Pt 2)**: 239-245.
 - Thompson, G. W., D. B. Hoover, J. L. Ardell and J. A. Armour (1998). "Canine intrinsic cardiac neurons involved in cardiac regulation possess NK1, NK2, and NK3 receptors." *Am J Physiol* **275**(5 Pt 2): R1683-1689.
 - Thureson-Klein, A. K. and R. L. Klein (1990). "Exocytosis from neuronal large dense-cored vesicles." *Int Rev Cytol* **121**: 67-126.
 - Topaloglu, A. K. (2010). "Neurokinin B signaling in puberty: human and animal studies." *Mol Cell Endocrinol* **324**(1-2): 64-69.
 - Topaloglu, A. K., J. A. Tello, L. D. Kotan, M. N. Ozbek, M. B. Yilmaz, S. Erdogan, F. Gurbuz, F. Temiz, R. P. Millar and B. Yuksel (2012). "Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism." *N Engl J Med* **366**(7): 629-635.
 - Tortora, G. J. and B. Derrickson (2014). *Principles of anatomy & physiology*. Danvers, MA, Wiley.
 - Tregear, G. W., H. D. Niall, J. T. Potts, S. E. Leeman and M. M. Chang (1971). "Synthesis of substance P." *Nat New Biol* **232**(29): 87-89.
 - Tremblay, Y., I. Tretjakoff, A. Peterson, T. Antakly, C. X. Zhang and J. Drouin (1988). "Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of a proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23): 8890-8894.

- Tsuboi, M., Y. Furukawa, K. Nakajima, F. Kurogouchi and S. Chiba (2000). "Inotropic, chronotropic, and dromotropic effects mediated via parasympathetic ganglia in the dog heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(3): H1201-1207.
- Tuluc, F., J. Meshki, S. Spitsin and S. D. Douglas (2014). "HIV infection of macrophages is enhanced in the presence of increased expression of CD163 induced by substance P." J Leukoc Biol **96**(1): 143-150.
- Unger, W. G., J. M. Butler, D. F. Cole, S. R. Bloom and G. P. McGregor (1981). "Substance P, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and somatostatin levels in ocular tissue of normal and sensorily denervated rabbit eyes." Exp Eye Res **32**(6): 797-801.
- Verhage, M., H. T. McMahon, W. E. Ghijsen, F. Boomsma, G. Scholten, V. M. Wiegant and D. G. Nicholls (1991). "Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals." Neuron **6**(4): 517-524.
- Von Euler, U. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J. Gaddum. London, J Physiol. **72**: 74-87.
- Von Euler, U. and B. Pernow (1956). "Neurotropic effects of substance P." Acta Physiol Scand **36**(3): 265-275.
- Walsh, R. J., W. B. Weglicki and R. Correa-de-Araujo (1996). "Distribution of specific substance P binding sites in the heart and adjacent great vessels of the Wistar white rat." Cell Tissue Res **284**(3): 495-500.
- Wang, Y., M. Shimada, Y. Xu, D. Hu, R. Nishio and A. Matsumori (2010). "Role of substance P in viral myocarditis in mice." Heart Vessels **25**(4): 348-352.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.
- Warner, M. R. and M. N. Levy (1989). "Inhibition of cardiac vagal effects by neurally released and exogenous neuropeptide Y." Circ Res **65**(6): 1536-1546.
- Wattchow, D. A., J. B. Furness, M. Costa, P. E. O'Brien and M. Peacock (1987). "Distributions of neuropeptides in the human esophagus." Gastroenterology **93**(6): 1363-1371.
- Webster Samuel, D. W. R. (2013). Embriología: lo esencial de un vistazo, Editorial Panamericana.
- Weihe, E., M. Reinecke and W. G. Forssmann (1984). "Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the mammalian heart. Interrelation with neurotensin- and substance P-like immunoreactive nerves." Cell Tissue Res **236**(3): 527-540.
- Weihe, E., M. Reinecke, D. Opherk and W. G. Forssmann (1981). "Peptidergic innervation (substance P) in the human heart." J Mol Cell Cardiol **13**(3): 331-333.
- Weinstock, J. V., A. Blum, J. Walder and R. Walder (1988). "Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P." J Immunol **141**(3): 961-966.
- Werge, T. (2007). "The tachykinin tale: molecular recognition in a historical perspective." J Mol Recognit **20**(3): 145-153.
- Wharton, J., J. M. Polak, L. Gordon, N. R. Banner, D. R. Springall, M. Rose, A. Khagani, J. Wallwork and M. H. Yacoub (1990). "Immunohistochemical

- demonstration of human cardiac innervation before and after transplantation." *Circ Res* **66**(4): 900-912.
- Wharton, J., J. M. Polak, G. P. McGregor, A. E. Bishop and S. R. Bloom (1981). "The distribution of substrate P-like immunoreactive nerves in the guinea-pig heart." *Neuroscience* **6**(11): 2193-2204.
 - Williams, P. L. and H. Gray (1989). *Gray's anatomy*. Edinburgh ; New York, Churchill Livingstone.
 - World Medical, A. (2013). "World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects." *Jama* **310**(20): 2191-2194.
 - Yamaguchi, K., T. Kugimiya and T. Miyazaki (2005). "Substance P receptor in U373 MG human astrocytoma cells activates mitogen-activated protein kinases ERK1/2 through Src." *Brain Tumor Pathol* **22**(1): 1-8.
 - Yamaguchi, K., M. D. Richardson, D. D. Bigner and M. M. Kwatra (2005). "Signal transduction through substance P receptor in human glioblastoma cells: roles for Src and PKCdelta." *Cancer Chemother Pharmacol* **56**(6): 585-593.
 - Yamazaki, K. and T. D. Allen (1990). "Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the "neuro-reticular complex"." *Am J Anat* **187**(3): 261-276.
 - Yang, T. and M. N. Levy (1992). "Sequence of excitation as a factor in sympathetic-parasympathetic interactions in the heart." *Circ Res* **71**(4): 898-905.
 - Yang, T. and M. N. Levy (1993). "Effects of intense antecedent sympathetic stimulation on sympathetic neurotransmission in the heart." *Circ Res* **72**(1): 137-144.
 - Yaoita, H., E. Sato, M. Kawaguchi, T. Saito, K. Maehara and Y. Maruyama (1994). "Nonadrenergic noncholinergic nerves regulate basal coronary flow via release of capsaicin-sensitive neuropeptides in the rat heart." *Circ Res* **75**(4): 780-788.
 - Yuan, M., Z. Wen-Xia, C. Jun-Ping and Z. Yong-Xiang (2005). "Age-related changes in the oestrous cycle and reproductive hormones in senescence-accelerated mouse." *Reprod Fertil Dev* **17**(5): 507-512.
 - Zakarian, S. and D. Smyth (1979). "Distribution of active and inactive forms of endorphins in rat pituitary and brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(11): 5972-5976.
 - Zhang, Y., A. Berger, C. D. Milne and C. J. Paige (2006). "Tachykinins in the immune system." *Curr Drug Targets* **7**(8): 1011-1020.
 - Zhang, Y., M. E. Devries and J. Skolnick (2006). "Structure modeling of all identified G protein-coupled receptors in the human genome." *PLoS Comput Biol* **2**(2): e13.
 - Zhang, Y., L. Lu, C. Furlonger, G. E. Wu and C. J. Paige (2000). "Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis." *Nat Immunol* **1**(5): 392-397.
 - Zhang, Y. and C. J. Paige (2003). "T-cell developmental blockage by tachykinin antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis." *Blood* **102**(6): 2165-2172.

- Zhu, W. and R. D. Dey (1992). "Distribution of the neuropeptide galanin in the cat heart and coexistence with vasoactive intestinal peptide, substance P and neuropeptide Y." J Mol Cell Cardiol **24**(1): 35-41.
- Ziche, M., L. Morbidelli, M. Pacini, P. Geppetti, G. Alessandri and C. A. Maggi (1990). "Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells." Microvasc Res **40**(2): 264-278.
- Zielinsky, P. (2009). Cardiología fetal.