



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Caracterización inmunohistoquímica del  
fenotipo celular muscular vascular en el seno  
carotídeo y sus cambios al envejecimiento en  
*Oryctolagus cuniculus***

**Edward Javier Acero Mondragón**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Departamento de Morfología Humana  
Bogotá, Colombia  
2012



**Caracterización inmunohistoquímica del  
fenotipo celular muscular vascular en el seno  
carotídeo y sus cambios al envejecimiento en  
*Oryctolagus cuniculus***

**Edward Javier Acero Mondragón  
Código: 599076**

**Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al  
título de: Magister en Morfología Humana**

Director:  
Doctor Pedro Gabriel Franco Maz  
Docente Facultad de Medicina  
Área Morfología Universidad Nacional

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Maestría en Morfología Humana  
Bogotá, Colombia  
2012

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

**Dr. Dimas Denis Contreras Villa**  
Jurado

---

**Dr. Enrique Altamar Ospino**  
Jurado

---

**Dr. Pedro Gabriel Franco Maz**  
Director Trabajo de Grado

Bogotá, Diciembre 4 de 2012

A mí amada hija Maria Juliana y mis sobrinos Juan Manuel, Laura Daniela, Camilo y Laura Natalia, genuinos hijos del siglo XXI donde el noventa y cinco por ciento de los “problemas” serán resueltos con tecnología que aun no existe; estudiar para comprender como funciona y participar en la creación y/o mejoría de su desempeño, es la tarea. Este es solo un ejemplo.

Con amor eterno:

Edward Javier



## **Agradecimientos**

Dr. Enrique Caro Henao. Director de la Maestría en Morfología Humana. Profesor de Embriología y Anatomía; Por su generosidad al aportar sus magnas perspectivas biológicas de la ciencia morfológica. Maestro de la biología del desarrollo y Anatomía pero sobre todo de la evidencia en la experiencia

Dr. Edgar Danilo Osuna. Profesor de Neuroanatomía; Por fundir literalmente como nadie la pasión por la neuroestructura clínica con todos los niveles biológicos. Maestro en la Neurología de los maestros

Dr. Carlos Arturo Florido. Profesor de Anatomía; Por sus enseñanzas anatómicas y su incesante desvelo en comunicarlo bien. Nada es saber si no se expresa bien. Maestro en la comunicación de la imperecedera “ciencia” humana

Dr. Eyner Lozano Marquez. Director del Departamento de Morfología. Profesor de Anatomía; Por su sensatez y elocuencia en la enseñanza de la anatomía quirúrgica, la estructura es o no es, así de simple. Maestro de la vida

Dr. Dimas Denis Contreras Villa. Profesor de Histología. Por su constante búsqueda del detalle que hace grandes diferencias y por sus lucidas conversaciones sobre lo que se cree divino entre lo humano. Maestro en la ilustración

Dr. Pedro Gabriel Franco Maz. Profesor de Histología. Por su sapiencia en la demostración de lo que falta dentro de lo aparentemente terminado. Maestro de la inagotable pregunta cuando la duda divide

Dra. Maria Ines Maldonado. Profesora de Histología; Dra Luz Amparo Arias Profesora de Anatomía; Dr. Andres Fernando Bula. Profesor de Anatomía, Por su ejemplo en el

exigido cumplimiento de los objetivos académicos de la que fue la segunda cohorte de la Maestría en Morfología Humana. Pero sobre todo por su generosidad en el conocimiento, fundado en el que juntos somos siempre más.

Paola Oviedo. Histotecnóloga del Departamento de Morfología. Por su excelencia y disciplina en el difícil arte que domina, sin el cual trabajos como estos no serían posibles.

Ingrid Calderón. Secretaria de la Maestría en Morfología.: Por su atenta gestión administrativa, con la cual en muchas ocasiones el devenir académico tomó forma.



## Resumen

El seno carotídeo es la mayor aferencia barorefleja, con la cual sistema nervioso autónomo ejerce modulación de la presión arterial sistémica. En grado variable, se ha demostrado clínicamente en humanos y experimentalmente en modelos murinos, caninos y lagomorfos, cómo su estimulación tiene un efecto hipotensor; sin embargo, la caracterización inmunohistoquímica del fenotipo celular muscular vascular contráctil o vascular smooth cell contraction (VSC-C) y el fenotipo celular muscular vascular sintético o vascular smooth cell synthetic (VSC-S) en el seno carotídeo y sus cambios al envejecimiento no han sido descritos.

Para el estudio se usaron 20 bloques de parafina con carótidas internas a la altura del seno carotídeo de *O. cuniculus* (n=10) machos de 7 semanas de edad y (n=10) machos de 104 semanas de edad para cortes a 3µm de grosor c/u, se inmuno marcaron para Smooth Muscle Actin  $\alpha$  (SMA-  $\alpha$ ) para VSC- C y Cellular Retinol Binding Protein 1 (CRBP-1) para VSC- S. En cantidad se encontró estadísticamente significativo ( $p<0,01$ ) un menor número de VSC-C en la túnica íntima de senos carotídeos de *O. cuniculus* de 7 semanas con respecto a los de 104 semanas; así mismo, se halló un mayor número de VSC-S en túnica íntima y media en los animales de 104 semanas de edad. En densidad celular se demuestra estadísticamente significativo ( $p<0,01$ ) para animales de 104 semanas cómo aumenta la túnica íntima de seno carotídeo disminuyendo paralelamente en la túnica media.

Palabras clave: Seno carotídeo, Leiomiocitos, Células musculares vasculares lisas

## Abstract

The carotid sinus baroreflex is most afferent with which the autonomic nervous system exerts modulation of systemic arterial pressure. With variability clinically it has been shown in humans and experimentally in murines, canines, and lagomorphs as their stimulation has a hypotensive effect, but immunohistochemical characterization of vascular contractile muscle cell phenotype (VSC-C) and vascular synthetic muscle cell phenotype (VSC-S) in the carotid sinus and their aging changes have not been described. 20 paraffin block were used with internal carotid sinus of *O. cuniculus* (n = 10) male and 7 weeks old (n = 10) males of 120 weeks old, were cuts to 3µm c / u and labeled with immunohistochemistry for α Smooth Muscle Actin (SMA-α) to VSC-C and Cellular Retinol Binding Protein 1 (CRBP-1) to VSC S. In quantity was found statistically significant (p <0.01) lower number of VSC-C in carotid sinus íntima to *O. cuniculus* of 7 weeks old respect to 120 weeks old, likewise, we found a greater number of VSC-S in túnica íntima and media in animals of 120 weeks old. In cell density, was demonstrate statistically significant increases in 120 weeks old in carotid sinus íntima with parallel decline in the túnica media.

**Keywords:** Carotid sinus. Leiomyocytes, Vascular smooth cell

# Contenido

	<b>Pág.</b>
Resumen y Abstract	IX
Lista de Figuras	XII
Listas de Tablas	XIII
Lista de Fotografías	XIV
Introduccion	1
1. Definicion del problema	3
2. Justificacion	5
3. Objetivos	7
3.1 Objetivo General	7
3.2 Objetivos Especificos	7
4. Marco Teórico	9
4.1 Presencia de leiomiocitos en los barorreceptores: visión comparada	10
4.2 Tipos de leiomiocitos vasculares	12
4.3 Consideraciones funcionales de los tipos de leiomiocitos	14
4.4 Leiomiocitos vasculares al envejecimiento	15
5. Metodología	17
5.1 Tipo de investigación	17
5.2 Población y muestra	17
5.3 Materiales y metodos	17
5.4 Selección del seno carotídeo	17
5.5 Estandarizacion inmunohistoquimica	20
5.6 Caracterización inmunohistoquímica del fenotipo celular muscular en el seno carotídeo y conteo celular	20
5.7 Análisis estadístico	23
6. Hipótesis	25
6.1 Hipotesis nula	25
6.2 Hipotesis alternativa	25
7. Resultados	26
8. Discusión	40
9. Conclusiones	48
Bibliografia	51

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Sección para establecimiento del grosor de tónicas vasculares y cantidad de células del seno carotídeo de <i>O. cuniculus</i> .	22
<b>Figura 2.</b> Distribución de Leiomiocitos en Seno Carótido de <i>O.cuniculus</i> de 7 semanas de edad	42
<b>Figura 3.</b> Distribución diferencial con cantidad de VSC-C y VSC-S en las tónicas vasculares de seno carotídeo de <i>O. cuniculus</i> de 104 semanas de edad.	43
<b>Figura 4.</b> Distribución diferencial con cantidad de VSC- C en las tónicas vasculares de seno carotídeo de <i>O. cuniculus</i> de 7 semanas y 104 semanas de edad	44
<b>Figura 5.</b> Distribución diferencial con cantidad de VSC-S en las tónicas vasculares de seno carotídeo de <i>O. cuniculus</i> de 104 semanas de edad.	45
<b>Figura 6.</b> Densidad de VSC- C y VSC-S en las tónicas vasculares de seno carotídeo de <i>O. cuniculus</i> de 7 semanas y 104 semanas de edad.	46

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Cantidad de Leiomiocitos vasculares contráctiles VSC-C inmunomarcados con SMA- $\alpha$ y de Leiomiocitos vasculares sintéticos VSC-S inmunomarcados CRBP-1, en las tónicas vasculares de seno carotídeo en <i>O. cuniculus</i> de 7 semanas de edad	33
<b>Tabla 2.</b> Cantidad de leiomiocitos vasculares contráctiles VSC-C inmunomarcados con SMA- $\alpha$ y de leiomiocitos vasculares sintéticos VSC-S inmunomarcados CRBP-1, en las tónicas vasculares de seno carotídeo en <i>O. cuniculus</i> de 104 semanas de edad.	36
<b>Tabla 3.</b> Test de Wilcoxon de leiomiocitos vasculares contráctiles VSC-C inmunomarcados con SMA- $\alpha$ en cada una las tónicas vasculares de seno carotídeo en <i>O. cuniculus</i> de 7 semanas de edad y de 104 semanas de edad.	37
<b>Tabla 4.</b> Test de Wilcoxon de leiomiocitos vasculares sintéticos VSC-S inmunomarcados con CRBP-1, en cada una las tónicas vasculares de seno carotídeo en <i>O. cuniculus</i> de 7 semanas de edad y de 104 semanas de edad.	38
<b>Tabla 5.</b> Test de Wilcoxon para densidad celular en las tónica de seno carotídeo de <i>O. cuniculus</i> de 7 semanas de edad y 104 semanas de edad.	39

## Lista de fotografías

**Foto 1.** Mucosa y submucosa de colon de *O. cuniculus*.

**Foto 2.** Mucosa y submucosa de colon de *O. cuniculus*.

**Foto 3.** Corte transversal con H&E a la altura del cuerpo carotídeo de *O. cuniculus*,

**Foto 4.** Carótida interna a la altura del seno carotídeo de *O. cuniculus* de 7 semanas de edad, con inmunohistoquímica para SMA-  $\alpha$  contrastada con hematoxilina

**Foto 5.** Carótida interna a la altura del seno carotídeo de *O. cuniculus* de 7 semanas de edad, con inmunohistoquímica para CRBP-1 contrastada con hematoxilina

**Foto 6.** Carótida interna a la altura del seno carotídeo de *O. cuniculus* de 104 semanas de edad, con inmunohistoquímica para SMA-  $\alpha$  contrastada con hematoxilina.

**Foto 7.** Carótida interna a la altura del seno carotídeo de *O. cuniculus* de 104 semanas de edad, con inmunohistoquímica para CRBP-1 contrastada con hematoxilina.

## Introducción

“In Vitro” a las células musculares vasculares lisas (VSC) envejecidas, se les ha demostrado función sintética/proliferativa/migratoria<sup>1,2,3</sup> por la expresión de quinasas activadas por mitógenos o - Mitogen-activated protein kinases o (p44 MAPK); así mismo “in Vitro” a células VSC jóvenes, se les ha demostrado una función contráctil y no proliferante por expresión de p38 MAPK<sup>4</sup>.

Hoy, morfológicamente se describen esas dos poblaciones de VSC así: los ahusados de función contráctil o VSC-C, inmunohistoquímicamente reconocidos con Alfa-actinas de músculo liso o Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin (SMA- $\alpha$ )<sup>5</sup>, Miosinas de cadena pesada de músculo liso o Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SMMHC)<sup>6</sup>, Calponinas (CN)<sup>7</sup>, H-Caldesminas (CALD1)<sup>8</sup>, y Smoothelin- A/B; y los de forma romboidal de función sintética/proliferante/migratoria o VSC-S<sup>9,10,11</sup>, reconocidos con proteína celular ligadora

---

<sup>1</sup> MC.CAFFREY, Timothy A., *et al.* The Increased Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells Isolated from Old Rats Is Associated with Increased Platelet-derived Growth Factor-like Activit. *Exp. MED.* 1988. vol. 167, p.163-174. En <http://jem.rupress.org/content/167/1/163.long>

<sup>2</sup> PORRECA, E., *et al.* Protein kinase C pathway and proliferative response of aged and young rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1993. vol. 104, p.137–145

<sup>3</sup> GENNARO, Giuseppa, *et al.* Role of p44/p42 MAP Kinase in the Age-Dependent Increase in Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neoíntimal Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003. vol. 23, p.204-210. En: <http://atvb.ahajournals.org/content/23/2/204.full.pdf>

<sup>4</sup> TOCK, J., *et al.* Induction of SM-alpha-actin expression by mechanical strain in adult vascular smooth muscle cells is mediated through activation of JNK and p38 MAP kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. vol. 301, p.1116–1121

<sup>5</sup> GABBIANI, G., *et al.* Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981. vol. 78, p.298–302

<sup>6</sup> NAGAI, R., *et al.* Identification of two types of Smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J. Biol. Chem.* 1989. vol. 264, p.9734–9737

<sup>7</sup> GIMONA, M., *et al.* Small, Calponin and SM 22 isoforms in avian and mammalian smooth muscle. Absence of phosphorylation in vivo. *J. Biochem.* 1992. vol. 205, p.1067–1075

<sup>8</sup> FRID, M.G., *et al.* changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin, *va Dev. Biol.* 1992. vol. 153, p.185–193

<sup>9</sup> RENSEN, S.S.M., *et al.* Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal,* 2007. vol. 15, no. 3, p.100-108

de retinoles o Cellular Retinol Binding Protein 1 (CRBP-1). "In situ" en cada vaso sanguíneo las células descritas VSC-C y VSC-S, tienen un patrón fenotípico que cambian en función de la edad.

---

<sup>10</sup> OWENS, G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995. vol. 75, p.487–517

<sup>11</sup> OWENS, G.K., *et al.* Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004. vol. 84, p.767-801



# 1. Definición del problema

El seno carotídeo es la mayor aferencia barorefleja con la cual sistema nervioso autónomo ejerce modulación de la presión arterial sistémica; estudios en humanos adjudican el estado hipertenso a una disfunción del barorreceptor asociada al envejecimiento. En humanos y animales, su estimulación ha generado en grado variable efectos hipotensores y desde entonces, novedosas experiencias han movido al sistema nervioso simpático hacia el centro de la medicina cardiovascular, porque parece ser un eje central en la génesis de la hipertensión. Como resultado de este interés, es cada vez mayor el número de experiencias reportadas de terapias antihipertensivas con implantes electrónicos carotídeos perivasculares al seno carotídeo, que buscan la activación simpática en pacientes hipertensos de grupos etáreos mayores. Sin embargo, dado que se han reportado grados variables de respuesta al implante, según determinada posición de electrodos en relación con el nervio o seno carotídeo, éste trabajo busca mediante la caracterización inmunohistoquímica del fenotipo celular muscular vascular entre el tipo contráctil (VSC-C) y fenotipo celular muscular sintético/proliferante/migrante (VSC-S), aportar a la comprensión de la variabilidad de respuesta al implante carotídeo, en el seno carotídeo al envejecimiento, usando el modelo experimental animal lagomorfo.



## **2. Justificación**

“In Vitro” se deduce un comportamiento de células vasculares musculares lisas VSC fenotípicamente no siempre estables e irreversibles. Así la opinión actual, es que las VSC tienen un comportamiento binario, con capacidad de asumir estados de función contráctil (VSC-C) o sintética/proliferante/migratoria (VSC-S), estados a su vez, dinámicos y que cambian en función del aumento de la edad.



## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Caracterización inmunohistoquímica del fenotipo celular muscular vascular en el seno carotídeo y sus cambios con el envejecimiento en *Oryctolagus cuniculus*.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterización inmunohistoquímica del fenotipo celular muscular vascular contráctil en el seno carotídeo y sus cambios con el envejecimiento en *Oryctolagus cuniculus*
- Caracterización inmunohistoquímica del fenotipo celular muscular vascular sintético en el seno carotídeo y sus cambios con el envejecimiento en *Oryctolagus cuniculus*.



## 4. Marco teórico

Los cambios en el ambiente interno y/o externo de los vertebrados modifican súbitamente la presión sanguínea; barorreceptores filogenéticamente conservados en paredes de los vasos sanguíneos son los responsables de hacer homeostasis presora<sup>12,13,14</sup>.

En los peces elasmobranquios, los barorreceptores se ubican dentro de las branquias, mas exactamente en las arterias branquiales aferentes y eferentes<sup>3</sup>; en los peces óseos preferentemente se ubican en las arterias branquiales aferentes<sup>15,16,17</sup>; en los anfibios se ubican en las arterias pulmocutáneas<sup>2,18</sup>, aunque se han descrito en los arcos aórticos<sup>19</sup>; en los reptiles se encuentran en el tronco arterio-pulmonar<sup>20,21,22</sup> y en las aves se han reportado en aorta ascendente y su arco<sup>23,24</sup>.

---

<sup>12</sup> BOYD, J.D. Nerve supply to the branchial arch arteries of vertebrates. *J. Anat.* 1936. vol. 71, p. 157-158

<sup>13</sup> JONES, R.D, MILSOM W.K. Peripheral receptors affecting breathing and cardiovascular function in non-mammalian vertebrates. *J. exp. Biol.* 1982. vol. 100, p.59-91

<sup>14</sup> TAYLOR, E.W., JORDAN, D., and COOTE, J.H. Central Control of the Cardiovascular and Respiratory Systems and Their Interactions in Vertebrates. *Physiol Rev.* 1999. vol. 79, no. 3, p. 855-916. En <http://physrev.physiology.org/content/79/3/855.full#xref-ref-24-1>

<sup>15</sup> BAGSHAW, R. Evaluation of cardiovascular baroreceptor control. *Biol. Rev.* 1985. vol. 60, p.121-162

<sup>16</sup> NILSSON, S., and SUNDIN, L. Gill blood flow control. *Comp Biochem Physiol* 1998. vol. 119, p.137-147

<sup>17</sup> SANDBLOM, E., AXELSSON, M.. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout *Exp Biol* 2005. vol. 208, p.821-829

<sup>18</sup> SMITH, D.G., BEROER, P.J., and EVANS, B.K. Baroreceptor control of heart rate in the conscious toad *Bufo marinus*. *Am.J. Physiol.* 1981. vol. 341, p.307-311

<sup>19</sup> ROGERS, D.C. Possible baroreceptor nerve endings in the vicinity of the amphibian carotid labyrinth. 1964. *da anat.* vol. 57, p.253-266

<sup>20</sup> BERGER, B.K.E., and SMITH, G. Localization of baroreceptors and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in the lizard *trachydosaurus rugosus*. *J. Exp. Biol.* 1980. vol. 86, p. 197-209. En <http://jeb.biologists.org/content/86/1/197.full.pdf>

<sup>21</sup> SHIRER, H.W., and TRANK, J.W. Circulatory mechanoreceptors in the pond turtle *Pseudemys scripta* Faraci FM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1982. vol. 242, no. 3, p.216-219

En los mamíferos los barorreceptores se han demostrado en el cayado aórtico y en el inicio de la carótida interna llamándose respectivamente seno aórtico y seno carotídeo<sup>25</sup>. Cuando en los mamíferos no hay carótida interna, el seno carotídeo “homologo” se encuentra ubicado en la arteria occipital<sup>26</sup>.

## 4.1 Presencia de leiomiocitos en los barorreceptores: visión comparada

El barorreceptor en los peces se encuentra en las agallas, (en teleosteos son cuatro pares bilaterales), cada agalla esta formada por dos hemibranquias paralelas que se subdividen en filamentos llamados lamelas, que a su vez están recubiertas por el epitelio que establece el intercambio de gases<sup>27</sup>, debajo del epitelio hay una matriz extracelular con columnas de colágeno que se distribuyen perivascularmente a vasos sanguíneos intralamelares; entre los haces de colágeno y epitelio “laminar” células llamadas “pilares”, tienen un rol funcional de célula muscular lisa vascular contráctil asociada al barorreceptor<sup>28</sup>, demostrado por concentración elevada de actina y miosina<sup>29</sup> y que se contraen por acción de la endotelina 1 –ET-1<sup>30</sup>.

---

<sup>22</sup> ALTIMIRAS, J., FRANKLIN, C.E., and AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. J Exp Biol.1998. vol. 201, p.2235–2242

<sup>23</sup> LUCITTI, J.L., and HEDRICK, M.S. Characterization of baroreflex gain in the domestic pigeon (*Columba livia*). Comp Biochem Physiol. 2006. vol.143, part A, p.103–111

<sup>24</sup> TAHA, A.A. Effects of denervation on baroreceptor and chemoreceptor endings in the aorta and pulmonary trunk of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). J. Anat.1987. vol. 150, p.49–60

<sup>25</sup> SANDBLOM. Op.cit.

<sup>26</sup> ABDEL-MAGIED E.M. Ultrastructure of carotid baroreceptors in the goat. Tissue and Cell, 1992. vol. 24, no. 5, p.681-687

<sup>27</sup> JH KUDO, H., KATO, A., HIROSE, S. Fluorescence Visualization of Branchial Collagen Columns Embraced by Pillar Cells. Cytochem 2007. vol. 55, p.57. En: <http://jhc.sagepub.com/content/55/1/57.full.pdf>

<sup>28</sup> MISTRY, A.C., et al. FHL5, a novel actin-binding protein, is highly expressed in eel gill pillar cells and responds to wall tension. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004. vol. 287, p.R1141–1154

<sup>29</sup> SUNDIN, L., and NILSSON, G.E. Endothelin redistributes blood flow through the lamellae of rainbow trout gills. J Comp Physiol 1998. vol. 168, p.619–623

<sup>30</sup> FARRELL, A.P. Cardiovascular changes in the lingcod (*Ophiodon elongatus*) following adrenergic and cholinergic drug infusions. J. Exp. Biol. 1981. vol. 91, p.293-305



El barorreceptor en los anfibios, específicamente en los anuros, se halla intrapulmonar; en ellos, las estructuras bronquioalveolares que los conforman son saculares, revestidas por epitelio ciliado que cubre a los tabiques de tejido conectivo, estos de variada longitud, llamados según ese criterio, tabiques primarios (cortos), secundarios (largos), terciarios (muy largos); entre los tabiques descritos suelen encontrarse ramas vasculares pulmocutáneas venosas y arteriales, donde la túnica media tiene leiomiocitos libres o sin un patrón de distribución asociados al barorreceptor<sup>31</sup>; sobre estos leiomiocitos se han demostrado efectos vasodilatadores siendo estimulados por Acetilcolina y Oxido Nítrico<sup>32,33</sup>.

El barorreceptor que en los reptiles esta ubicado en el tronco arterioso, las arterias pulmonar y arterias carótidas, tiene leiomiocitos organizando un músculo liso en la túnica media y es sobre ellos que se ha ubicado la asociación con el barorreceptor, e incluso se les han demostrado receptores para Endotelina-1<sup>34</sup> así como receptores colinérgicos<sup>35</sup> y alfa adrenérgicos<sup>36</sup>.

El barorreceptor en aves hallado en la raíz de la aorta y su arco, con menor proporción en arteria pulmonar y sus ramas izquierda y derecha; las zonas reflexógenas asociadas

---

<sup>31</sup> ZACCONE, G., et al. Immunohistochemical study of the innervation of pulmonary vessels and smooth muscles in the respiratory tract of two frog species. *Acta Histochem* 2004. vol. 106, p.179–193, En: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128104000030>

<sup>32</sup> NNINGS, B.L., and DONALD, J.A., Neurally-derived nitric oxide regulates vascular tone in pulmonary and cutaneous arteries of the toad, *Bufo marinus*. *JAm J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008. vol. 295, no. r1640–r1646  
En: <http://ajpregu.physiology.org/content/295/5/R1640.full.pdf>

<sup>33</sup> SMITS, A.W., WEST, N.H., and BURGGREN, W.W. Pulmonary fluid balance following pulmocutaneous baroreceptor denervation in the toad. *J Appl Physiol*. 1986 Jul. vol. 61, no. 1, p. 331-7.  
En: [http://www.biol.unt.edu/~burggren/PDFs/1986/\(54\)Smits,West,Burggren1986JAP.pdf](http://www.biol.unt.edu/~burggren/PDFs/1986/(54)Smits,West,Burggren1986JAP.pdf)

<sup>34</sup> [SKOVGAARD, N.](#), et al. Hypoxia-induced vasoconstriction in alligator (*Alligator mississippiensis*) intrapulmonary arteries: a role for endothelin-1? *J Exp Biol*. May 2008. vol. 211 (pt 10), p.1565-70

<sup>35</sup> CROSSLEY, D.A., HICKS, J.W., and ALTIMIRAS, J. Ontogeny of baroreflex control in the American alligator *Alligator mississippiensis*. *The Journal of Experimental Biology* 2003. vol. 206, p.895-2902

<sup>36</sup> BERGER Y.P.J., EVANS, B.K., and SMITH, D.G. Localization of baroreceptors and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in the lizard *trachydosaurus rugosus*. *J. exp. Biol*. 1980. vol. 86, p.197-209. En: <http://jeb.biologists.org/content/86/1/197.full.pdf>

se hallan en la túnica media arterial donde no hay la alternancia típica en túnica media de laminas elásticas y leiomiocitos que se describen en los mamíferos<sup>37</sup>.

En los mamíferos sobre el barorreceptor ubicado en la arteria carótida interna y en el cayado aórtico<sup>38</sup> se ha demostrado en la túnica media de estos vasos sanguíneos la presencia de leiomiocitos en distribución circular en la zona reflexógena, tanto en caninos<sup>39,40</sup>, felinos<sup>41</sup>, roedores<sup>42</sup>, lagomorfos<sup>43</sup>, equinos<sup>44</sup>; y cuando en este grupo taxonómico la rama de la carótida común no genera carótida interna, los leiomiocitos han sido descritos también en distribución circular en la túnica media de las arterias occipitales<sup>45,46</sup>.

## 4.2 Tipos de leiomiocitos vasculares

Tras los reflejos cardiorrespiratorios expuestos por Hering a mediados de 1920<sup>47,48</sup>, y demostrados experimentalmente por la estimulación eléctrica del seno carotídeo en animales, se generaron por primera vez aproximaciones de la organización histológica

---

<sup>37</sup> TAHA, A.A.M., ABDEL-MAGIED, E.M., and KING, A.S. Ultrastructure of aortic and pulmonary baroreceptors in the domestic fowl. *J. Anat.* 1983. vol. 137, no. 1, p.197-207

<sup>38</sup> DE CASTRO, Fernando. Towards the sensory nature of the carotid body: Hering, De Castro and Heymans. Edited by: Javier De Felipe. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2009. vol. 3, no. 23, p.1-11

<sup>39</sup> REES, P.M. Electron microscopical observations on the architecture of the carotid arterial walls, with special reference to the sinus portion. *J. Anat.* 1968. vol. 103, no.1, p. 35-47

<sup>40</sup> BOSS, J., and GREEN, J.H. The Histology of the Common Carotid Baroreceptor Areas of the Cat.. *Circulation Research* 1956. vol. 4, p.12-17

<sup>41</sup> SEAGARD, J.L., *et al.* Firing characteristics of single-fiber carotid sinus baroreceptors.. *Circ. Res.* 1990. vol. 66, p-1499-1509

<sup>42</sup> [HANSEN, J.T.](#) Morphology of the carotid sinus wall in normotensive and spontaneously hypertensive rats. [Anat Rec.](#) Aug 1987. vol. 218, no. 4, p.426-33.

<sup>43</sup> BARKER, S.G.E., *et al.* The vasa vasorum of the rabbit carotid artery. *Anat.* 1992. vol. 180, p. 225-231, with 6 figures Printed in Great Britain

<sup>44</sup> KHAMAS A.W.H *et al.* Terminal branches of the common carotid artery in mule with emphasis on the carotid body and carotid sinus. *Veterinarski Arhiv* 2002. vol. 72, no.1, p.1-10

<sup>45</sup> ABDEL-MAGIED, E.M. Ultrastructure of carotid baroreceptors in the goat. *Tissue And Cell*, 1992. vol. 24, no. 5, p.681-687

<sup>46</sup> PARCHAMI, A., FATAHIAN DEHKORDI, R.A., and DERAKHSHAN, A. Comparative histomorphometric study of the common carotid artery and its terminal branches in sheep and goats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2009. vol. 12, no 3, p.165-170

<sup>47</sup> A study of the hering breuer reflex. *J. Exp. Med Moore RL.* 1927. p.46-819

<sup>48</sup> WIDDICOMBE, J. Reflexes from the lungs and airways: historical perspective. *J Appl Physiol.* 2006. vol. 101, p.628 – 634

del seno carotídeo por De Castro en 1928, quien por histoquímica de plata reducida de Cajal y Azul de Metileno de Erlich, demostró la presencia de leiomiocitos “por primera vez” en un bulbo de pared delgada en el origen de la arteria occipital de bovinos, el cual estaba inervado con una distribución análoga a aquella encontrada en la pared delgada del bulbo de la arteria carótida interna, por encima de su origen en la arteria carótida común de los humanos<sup>49</sup>; con el desarrollo de la microscopía electrónica, los estudios de Ress (1968) describieron en gatos, conejos y humanos la presencia de leiomiocitos libres en la túnica media de la pared del seno carotídeo; y por esta misma técnica, la descripción morfológica normal de la túnica media del seno carotídeo se ha descrito como del tipo elástico por contener leiomiocitos distribuidos circularmente entre los haces de fibras elásticas, lo cual se ha evidenciado en estudios independientes y en representantes de grupos taxonómicos tan disímiles como felinos, aves, ovinos y lagomorfos<sup>50</sup>.

Con el advenimiento de los cultivos celulares de leiomiocitos vasculares o VSC, los estudios pioneros “in Vitro de Ross (1971) revelaron en ellos morfologías y funciones similares a las de fibroblastos<sup>51</sup>, abriéndose la descripción morfológica a dos poblaciones de leiomiocitos vasculares así: los ahusados relacionados con función de contracción o VSC-C y los de forma “romboide” relacionados con una función sintética, proliferante y migratoria o VSC-S<sup>52,53,54</sup>. Los estudios moleculares contemporáneos establecen esa diferencia, e incluso se sabe como la promoción del fenotipo contráctil VSC-C es lograda por represión transcripcional de los factores de transcripción hélice-asa-hélice<sup>55,56</sup>, que

---

<sup>49</sup> DE CASTRO, Fernando. Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères. Nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum. 1928. Trav. Lab. Rech. Biol. vol. 25, p.331–380.

<sup>50</sup> REES, P.M., and JEPSON, P. Measurement of Arterial Geometry and Wall Composition In the Carotid Sinus Baroreceptor Area. Circulation Research 1970. vol. 26, p.461-467

<sup>51</sup> ROSS, R. The smooth muscle cell growth of Smooth Muscle In culture and format Ion of elastic fibers. Journal Of Cell Biology 1971. vol. 50, p.172-186

<sup>52</sup> RENSEN, S.S.M., *et al.* Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. Netherlands Heart Journal, 2007. vol. 15, no. 3, p.100-108

<sup>53</sup> OWENS, G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. Physiol Rev 1995. vol. 75, p.487–517

<sup>54</sup> OWENS, G.K., *et al.* Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. Physiol Rev 2004. vol. 84, p.767-801

<sup>55</sup> MORROW, David, *et al.* Notch and Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. Circ. Res. 2008. vol. 103, p.1370-1382

permiten la expresión de un único repertorio de marcadores, que incluyen alfa actina de músculo liso o Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin (SMA- $\alpha$ )<sup>57</sup>, cadena pesada de miosina de músculo liso o Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SMMHC)<sup>58</sup>, Calponina (CN)<sup>59</sup>, H-Caldesmina (CALD1)<sup>60</sup>, y Smoothelin- A/B; desde el mismo punto de vista, se sabe cómo la promoción del fenotipo sintético o VSC-S, esta relacionada con la activación del factor de transcripción de la familia dedos de zinc GATA-6<sup>61</sup>, el cual induce disminución de la expresión de las proteínas marcadoras de leiomiocitos musculares desdiferenciándola y aumentando la expresión del marcador proteína celular ligadora de retinoles o Cellular Retinol Binding Protein 1 (CRBP-1).

### 4.3 Consideraciones funcionales de los tipos de leiomiocitos

A los VSC-C se les relaciona con una baja tasa de proliferación y se consideran altamente especializados por su función de contracción y relajación en la modificación activa del diámetro vaso sanguíneo y tono vascular, dando como resultado cambios en la distribución y en la presión sanguínea<sup>62</sup>. A los VSC-S se les relaciona con poca especialización contráctil, pero muy proliferantes, con capacidad de migración y función

---

<sup>56</sup> NISHIDA, W., *et al.* A triad of serum response factor and the GATA and NK familias governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes. *J Biol Chem*. 2002. vol. 277, p.7308–7317

<sup>57</sup> GABBIANI, G., *et al.* Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981. vol. 78, p.298–302

<sup>58</sup> NAGAI, R., *et al.* Identification of two types of Smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J. Biol. Chem.* 1989. vol. 264, p.9734–9737

<sup>59</sup> GIMONA, M., *et al.* Small, Calponin and SM 22 isoforms in avian and mammalian smooth muscle. Absence of phosphorylation in vivo. *J. Biochem.* 1992. vol. 205, p.1067–1075

<sup>60</sup> FRID, M.G., *et al.* changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin, *va Dev. Biol.* 1992. vol. 153, p.185–193

<sup>61</sup> LEPORE John J., *et al.* GATA-6 Regulates Genes Promoting Synthetic Functions in Vascular Smooth Muscle Cells *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005. vol. 25, p.1-6

<sup>62</sup> BIAA, D., *et al.* El músculo liso vascular de las grandes arterias: ¿sitio de control local de la función de amortiguamiento arterial? *Rev Esp Cardiol.* 2003. Vol. 56, no. 12, p.1202-9

sintética de colágeno, elastina proteoglicanos, caderinas e integrinas, por lo cual se consideran partícipes en la remodelación activa del vaso sanguíneo<sup>63</sup>.

#### 4.4 Leiomiocitos vasculares y envejecimiento

Primeros estudios experimentales “in Vitro” sobre el envejecimiento de VSC, han demostrado comportamientos disímiles, como un mayor estatus proliferativo de VSC en aortas de roedores envejecidos que de aquellos VSC provenientes de aortas de roedores jóvenes<sup>64,65</sup> y lagomorfos<sup>66</sup>.

“In Vitro” también con VSC envejecidos de roedores, la perspectiva molecular ha revelado promoción mayor de la proliferación y migración, debido a una mayor expresión de proteína kinasa activada por mitogenos o Mitogen-activated protein kinases – (ERK ½,) también conocido como p44/p42 MAPK, relacionándose dicha expresión con la mayor promoción de sobrevivencia<sup>67</sup>, comportamiento similar “in vitro” hallado en VSC envejecidos de lagomorfo<sup>68</sup> y VSC envejecidos de humanos<sup>69</sup>. Por otro lado, un estudio también “in vitro” en VSC jóvenes del modelo roedor, ha establecido por primera vez, un mayor mantenimiento del estatus contráctil no proliferante por expresión de p38 MAPK<sup>70</sup>.

---

<sup>63</sup> WALKER-CAPRIOLOGLIO, H.M., KOOB, T.J., and MCGUFFEE, L.J. Proteoglycan synthesis in normotensive and spontaneously hypertensive rat arteries in vitro. *Matrix*. 1992. vol. 12, p.308–320

<sup>64</sup> MC.CAFFREY, Timothy A., *et al.* The Increased Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells Isolated from Old Rats Is Associated with Increased Platelet-derived Growth Factor-like Activit. *Exp. MED.* 1988. vol. 167, p.163-174. En <http://jem.rupress.org/content/167/1/163.long>

<sup>65</sup> PORRECA, E., *et al.* Protein kinase C pathway and proliferative response of aged and young rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1993. vol. 104, p.137–145

<sup>66</sup> GENNARO, Giuseppa, *et al.* Role of p44/p42 MAP Kinase in the Age-Dependent Increase in Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neoíntimal Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003. vol. 23, p.204-210. En: <http://atvb.ahajournals.org/content/23/2/204.full.pdf>

<sup>67</sup> LUNDBERG, Martha S., *et al.* J Regulation of Vascular Smooth Muscle Migration by Mitogen-activated Protein Kinase and Calcium/Calmodulindependent Protein Kinase II Signaling Pathways. *Mol Cell Cardiol* 30. 1998. p.2377–2389

<sup>68</sup> ROY, J., *et al.* Phenotypic modulation of arterial smooth muscle cells is associated with prolonged activation of ERK1/2. *Differentiation*. 2001. vol. 67, p. 50–58

<sup>69</sup> MIL, S., *et al.* Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1996 Jan. vol. 270, no. 1 pt 2, p.H142-50

<sup>70</sup> TOCK, J., *et al.* Induction of SM-alpha-actin expression by mechanical strain in adult vascular smooth muscle cells is mediated through activation of JNK and p38 MAP kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. vol. 301, p.1116–1121

Esta bien documentado que el seno carotídeo es la mayor vía moduladora de la presión arterial sistémica y que la estimulación nerviosa del nervio carotídeo en modelos animales experimentales, tales como roedores<sup>71,72</sup>, caninos<sup>73,74</sup>, lagomorfos<sup>75,76</sup> y en estudios clínicos en humanos<sup>77</sup>, tienen un efecto hipotensor; sin embargo, la caracterización inmunohistoquímica del fenotipo celular muscular vascular en el seno carotídeo y sus cambios al envejecimiento no han sido descritos.

---

<sup>71</sup> ABDALA, A.P. et al. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol.* 2012. vol. 590 (Pt 179), p.4269-77

<sup>72</sup> LATARO, R.M., et al. Baroreceptor and chemoreceptor contributions to the hypertensive response to bilateral carotid occlusion in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Dec 2010 vol. 299, no. 6, p.H1990-5

<sup>73</sup> LOHMEIER, T.E., et al. Sustained suppression of sympathetic activity and arterial pressure during chronic activation of the carotid baroreflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Aug 2010 vol. 299, no. 2, p.H402-9.

<sup>74</sup> GEORGAKOPOULOS, D., et al. Effects of electrical stimulation of the carotid sinus baroreflex using the Rheos device on ventricular-vascular coupling and myocardial efficiency assessed by pressure-volume relations in non-vagotomized anesthetized dogs. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009. p.2025-9

<sup>75</sup> XIE, P.L., et al. Rapid baroreceptor resetting in chronic hypertension. Implications for normalization of arterial pressure. *Hypertension.* 1991. Jan. vol. 17, no. 1, p.72-9.

<sup>76</sup> KAMIYA, A., et al. Closed-loop spontaneous baroreflex transfer function is inappropriate for system identification of neural arc but partly accurate for peripheral arc: predictability analysis. *J Physiol.* 2011. Apr 1. vol. 589, no. 7, p.1769-90

<sup>77</sup> BAKRIS, G.L., et al. Baroreflex activation therapy provides durable benefit in patients with resistant hypertension: results of long-term follow-up in the Rheos Pivotal Trial.. *J Am Soc Hypertens.* Mar-Apr 2012. vol. 6, no. 2, p.152-8

## **5. Metodología**

### **5.1 Tipo de investigación**

El presente estudio con dos grupos de animales es de tipo intervención experimental, analítico y descriptivo

### **5.2 Población y muestra**

Del orden lagomorfo, género macho, especie *Oryctolagus cuniculus* provenientes de una cunicultura comercial, un grupo experimental 10 de casos (n=10), con 7 semanas de edad fue llamado animales jóvenes; otro grupo experimental con 10 casos (n=10) de 104 semanas de edad fue llamado animales envejecidos. El establecimiento de los grupos reseñados contextualizó los resultados basados en las diferencias de edad.

De los grupos reseñados se obtuvieron veinte carótidas internas (10 por cada grupo) obteniéndolas a la altura de la bifurcación carotídea, a partir de cabezas de conejos destinados al consumo humano (Ver consideraciones éticas)

### **5.3 Materiales y métodos**

Se procesaron 20 bloques de parafina con carótidas internas a la altura de la bifurcación carotídea en el laboratorio de histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional, para cortes secuenciados a 3 micras de grosor c/u, y tinción convencional con Hematoxilina y Eosina.

### **5.4 Selección del seno carotídeo**

Con objetivo panorámico sobre las láminas de coloración con Hematoxilina y Eosina obtenidas, se establecieron los patrones de organización histológica vascular del seno

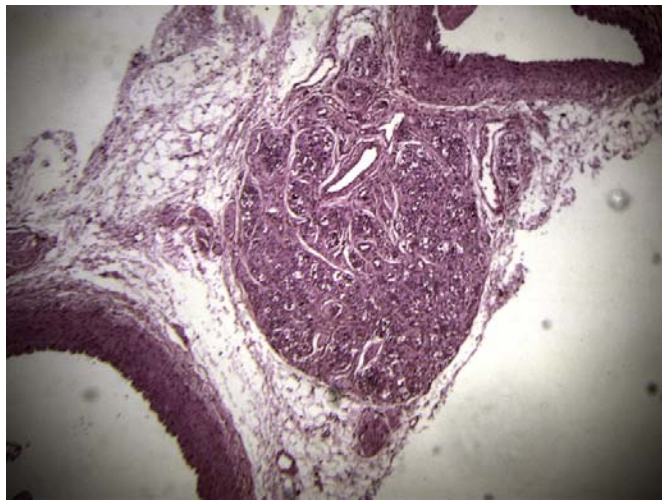
carotídeo, sugeridos por Rees y Jepson (1970) así: ubicación del cuerpo carotídeo entre los dos vasos arteriales y en aquella arteria que tuviese asimetría en su grosor en túnica media respecto a la otra, se consideró la carótida interna a la altura del seno carotídeo<sup>78</sup> (Foto 1).

**Foto 1.** Corte transversal con H&E a la altura del cuerpo carotídeo de *O. cuniculus*.

1a. 5x. Se muestra un panorámico; en el centro, la ubicación del cuerpo carotídeo, la flecha negra señala la arteria carótida interna.

1b. 10x. Se muestra un panorámico de la arteria carótida interna en relación con el cuerpo carotídeo abajo a la izquierda.

1c. 40x. Se aprecia un acercamiento de la carótida interna. Nótese la arteria con ligera asimetría en el grosor de la túnica media revelando la presencia del seno carotídeo.



1a

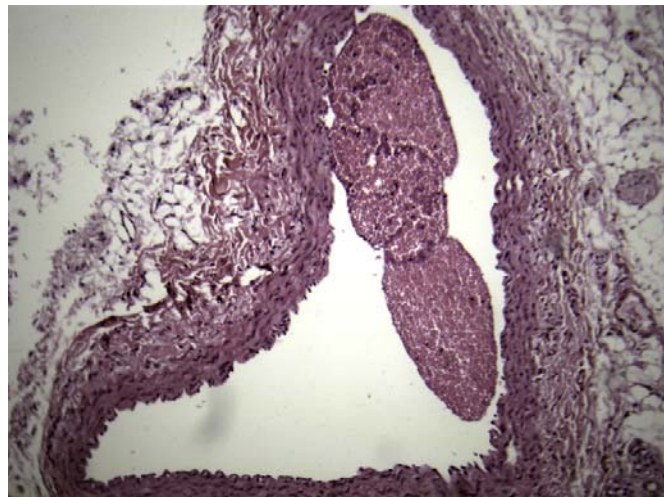
---

<sup>78</sup> REES, P.M., and JEPSON, P. Op.cit.





1b



1c

*Fuente: El autor. Noviembre de 2012*

Una vez seleccionado cada uno de los cortes con el seno carotídeo, se llevaron los bloques a un laboratorio de diagnóstico inmunohistoquímico comercial, con certificación de personería jurídica, vinculación a cámara y comercio, certificado para actividades por Secretaria de Salud de Bogotá en inmunohistoquímica convencional; allí se hizo inmunomarcación de SMA-  $\alpha$  para establecimiento de VSC- C y de CRBP-1 para establecimiento de VSC- S. El inmunomarcaje se hizo con kit's de la casa NOVOCASTRA, previa estandarización del inmunomarcaje por parte del autor a la concentración del anticuerpo reseñado por la casa comercial, esto es 1:100. En esta estandarización, el contraste histoquímico se hizo con hematoxilina y como control

positivo se hizo el mismo procedimiento para cortes histológicos de colon, también en el conejo *Oryctolagus cuniculus*.

## 5.5 Estandarización inmunohistoquímica

En el Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional fue procesado histotécnicamente un segmento de 0,5 cm de colon de conejo previamente fijado en Formol al 10%, para obtención de un bloque de parafina. La muestra de colon de conejo fue proveniente del Bioterio Central del Instituto Nacional de Salud, Bogotá Colombia.

Sobre el bloque de parafina se hicieron cortes histológicos a 3 $\mu$ m de grosor c/u, sobre las láminas obtenidas, previa desparafinización, se adicionaron anticuerpos contra SMA- $\alpha$  Casa NOVOCASTRA y CRBP-1 Casa NOVOCASTRA, coloreados con diaminobencidina (Sigma, St. Luis); los anticuerpos fueron adicionados en los dos inmunomarcajes reseñados a concentraciones recomendadas por el fabricante, 1:100 c/u. El contraste para su observación en el microscopio se hizo con coloración de hematoxilina.

Luego de corroborarse la coloración inmunohistoquímica con la concentración del anticuerpo reseñada, todos los cortes de los 20 bloques con senos carotídeos, fueron coloreados y todas las láminas obtenidas se observaron en microscopio fotónico Motic BA 300 con cámara digital incorporada.

## 5.6 Caracterización inmunohistoquímica del fenotipo celular muscular en el seno carotídeo y conteo celular.

El hallazgo celular de VSC-C o VSC-S se estableció cuando en objetivo a 100x se vió la coloración marrón propia del resultado inmunohistoquímico, así: para SMA-  $\alpha$ , color marrón de distribución citoplasmático contorneando el núcleo en células de forma ahusada en las tónicas vasculares; para CRBP-1, color marrón intranuclear asociado a formas celulares “romboides” en las tónicas vasculares.

Sobre las láminas histológicas inmunomarcadas de los grupos experimentales, se estableció un número del celular muscular de VSC-C marcados con SMA-  $\alpha$  y VSC-S marcados con CRBP-1; este número celular fue producto del promedio hallado en las cuatro regiones diferentes y opuestas entre sí del mismo corte del seno carotídeo, como procede Blomgren y Col (2008) para el conteo de fibras elásticas<sup>79</sup>, pero modificado por el presente autor usando métodos ecológicos de sección descritos por (BURNHAM Y Col 1980), el cual dicta que para el estudio de la abundancia de poblaciones en un trayecto lineal de un ecosistema, llamado “sección recta”, el observador se desplaza anotando todas las especies vistas o escuchadas a lo largo de la sección, en un ancho fijo “sección de ancho fijo”, este último siendo un número máximo de metros a cada lado de la ruta recta de muestreo<sup>80</sup>.

En breve para esta tesis, independiente de la forma vascular, se trazó una cruz partiendo desde el centro de la luz de la arteria carótida interna a la altura del seno carotídeo, cuando las líneas rectas trazadas atravesaron por cuatro lados el total de la pared vascular, se midió el grosor de cada túnica vascular del seno carotídeo, esto fue la “sección recta”; luego, perpendicular a la sección recta descrita, dentro de la pared vascular, tanto a la izquierda como a la derecha se midieron 150  $\mu\text{m}$  de longitud, (longitud promedio de leiomiocitos vasculares en carótidas en mamífero roedor<sup>81</sup>.) y en ese espacio o sección recta, se cuenta el número total de células halladas (Figura 1).

---

<sup>79</sup> BLOMGREN, Göktürk. A novel method for quantification of the folding of elastic laminae in elastic arteries. *Micron*. 2008. vol. 39, no. 5, p.623-630

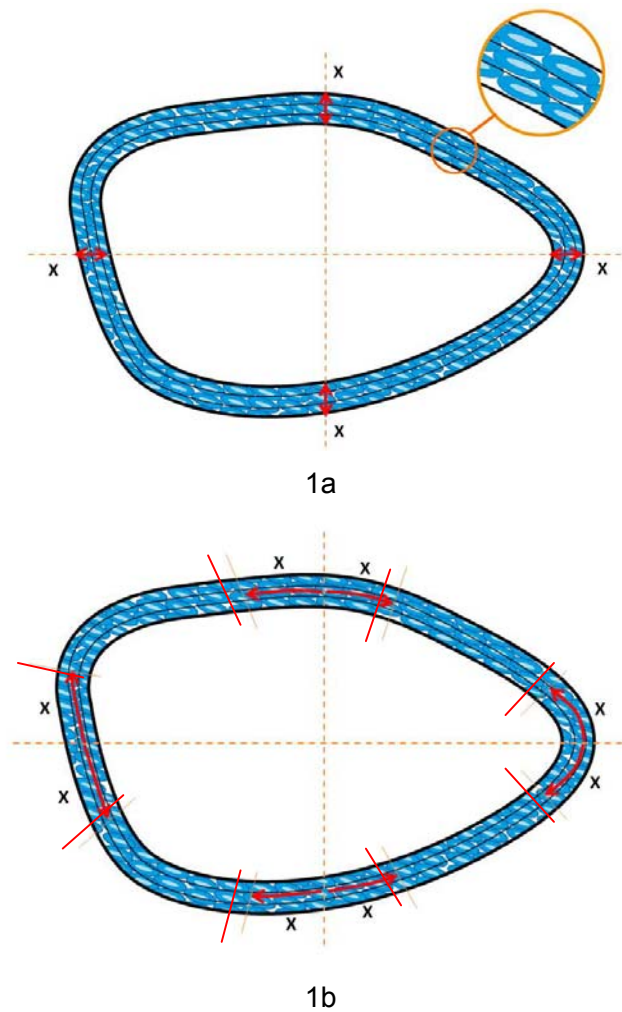
<sup>80</sup> BURNHAM, K.P., ANDERSON, D.R., and LAAKE, J.L. Estimation of density from line transect sampling of biological populations. *Wildl. Monograph* 1980. vol. 72, p.1-202

<sup>81</sup> BOLZON, I.B.J., and CHEUNG, D.W. Solation and Characterization of Single Vascular Smooth Muscle Cells From Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 1989. vol. 14, p.137-144

**Figura 1.** Sección para establecimiento del grosor de tónicas vasculares y cantidad de células del seno carotídeo de *O. cuniculus*.

1a. Sección recta en cuatro líneas opuestas entre sí para establecimiento del grosor de las tónicas vasculares del seno carotídeo de *O. cuniculus*; la "X" es la longitud total del vaso, el cual corresponde a la suma de la longitud de cada túnica expresada en micras.

1b. Sección de ancho fijo en cuatro cuadrantes opuestos entre si para establecimiento de la cantidad de células en las tónicas vasculares del seno carotídeo de *O. cuniculus*; las "X" al lado izquierdo y derecho de la sección recta, corresponden a la distancia en micras (150  $\mu$ m) sobre las cuales se hace el conteo celular.



Fuente: El autor. Noviembre de 2012

En los segmentos histológicos (Figura 1), el parámetro analizado con software MOTIC CAM, fue el grosor de las tunicas vasculares dados por sección recta expresada en micras (Figura 1a); el conteo del número celular dentro de cada sección de ancho fijo con cada inmunohistoquímica, fue hecho manualmente analizando en cada túnica a 100x y la cantidad de células fue expresada en número entero (Figura 1b); con los resultados de grosor de las tunicas y el número de células en cada una, se calculó la densidad de las células según método planteado por Kneubil *et al* (2006) para fibras elásticas, donde la densidad de fibras elásticas es producto de la división del grosor de cada túnica en el número de fibras halladas en cada túnica<sup>82</sup>. En la modificación por el autor del procedimiento descrito, se procedió así: se calculó el grosor de cada túnica, resultante de la sección recta y se dividió en el número de células inmunomarcadas contadas dentro de la sección ancha.

## 5.7 Análisis estadístico

El estudio experimental analítico descriptivo, usó la media como medida de tendencia central media  $\pm$  desviación estándar y por el número muestral con homogeneidad en el número de casos, se hizo el analítico estadístico no paramétrico Test de Wilcoxon, para establecer diferencias significativas en la distribución de los tipos de leiomiocitos contráctiles o sintéticos y su densidad en cada túnica histológica, así:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Donde el estadístico  $U$  se define como el mínimo de  $U_1$  y  $U_2$  y  $n_1$  y  $n_2$  son los tamaños respectivos de cada muestra,  $R_1$  y  $R_2$  es la suma de los rangos de las observaciones de las muestras 1 y 2 respectivamente. Bajo la hipótesis nula, las distribuciones de partida

---

<sup>82</sup> KNEUBIL, M.C., *et al*. Sequential histomorphometric study of the left internal thoracic artery Rev Bras Cir Cardiovasc 2006. vol. 21, no. 4, p. 371-376.

de ambas distribuciones es la misma y bajo la hipótesis alternativa, los valores de una de las muestras tienden a exceder a los de la otra, así:  $P(X > Y) + 0.5 P(X = Y) > 0.5$ .

Consideraciones éticas: Sobre el conejo *Oryctolagus cuniculus* de este estudio, se tuvieron consideraciones de principio ético en experimentación animal y fueron las tres R's de Russell y Burch, (1959) citado por Balls y Cols (1995)<sup>83</sup>, a saber: Reemplazo, Reducción y Refinamiento. Reemplazo al usar piezas anatómicas de animales comerciales destinados al consumo humano, en un criadero comercial (Cunicultura); Reducción porque se usaron 20 piezas anatómicas compuestas por cabezas (no destinadas al consumo), del cual se disecaron las carótidas; Refinamiento, porque no hubo intervención durante el mantenimiento del animal; y el único momento de manipulación fue el día del sacrificio programado dentro del cronograma de beneficio semanales con fines comerciales de la cunicultura

---

<sup>83</sup> BALLS M, *et al.* The Three Rs: the way forward. *Alternatives to Laboratory Animals* 1995. Vol 23, p. 838-866

## **6. Hipótesis**

### **6.1 Hipotesis nula**

No hay cambios en los fenotipos celulares musculares vasculares en el seno carotídeo de *Oryctolagus cuniculus* con el envejecimiento.

Si no hay diferencias significativas, se aceptará la hipótesis nula.

### **6.2 Hipotesis alternativa**

Hay cambios en los fenotipos celulares musculares vasculares en el seno carotídeo de *Oryctolagus cuniculus* con el envejecimiento.

Si hay diferencias significativas, se aceptará la hipótesis alternativa.

## 7.Resultados

La estandarización inmunohistoquímica evidenció inmunoreactividad sobre VSC-C, distribuidos sobre la túnica media de los vasos sanguíneos en la submucosa de colon en *O. cuniculus*, así como en la muscular mucosae (Foto 2); marcaje logrado con las concentraciones 1:100 recomendadas por la casa del kit NOVOCASTRA para el anticuerpo frente a SMA- $\alpha$ . A la misma concentración de anticuerpos (1:100), el inmunomarcaje para CRBP-1, mostró inmunoreactividad sobre VSC-S distribuidos en túnica media e íntima de los vasos sanguíneos de la submucosa de colon en *O. cuniculus* (Foto 3).

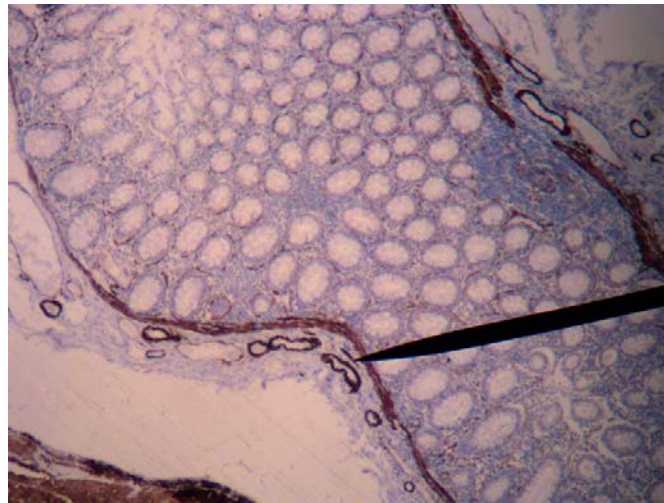
**Foto 2.** Mucosa y submucosa de colon de *O. cuniculus*.

2a. Mucosa y submucosa de colon, señalando vasos sanguíneos en la submucosa con inmunohistoquímica para SMA-  $\alpha$  en concentración 1:100 y contrastada con hematoxilina en 5x.

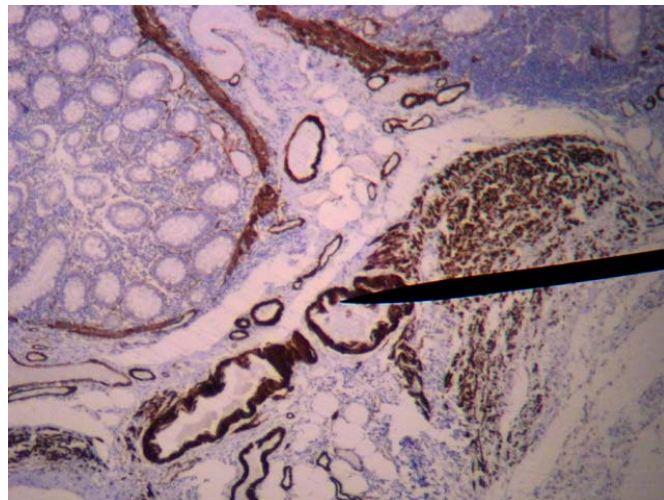
2b. Acercamiento en submucosa de colon, que muestra vasos sanguíneos con inmunohistoquímica para SMA-  $\alpha$  contrastada con hematoxilina en 10x.

2c. Acercamiento en submucosa de colon, que muestra la túnica media de vasos sanguíneos con inmunohistoquímica para SMA-  $\alpha$  mostrando los VSC-C contrastada con hematoxilina a 100x.

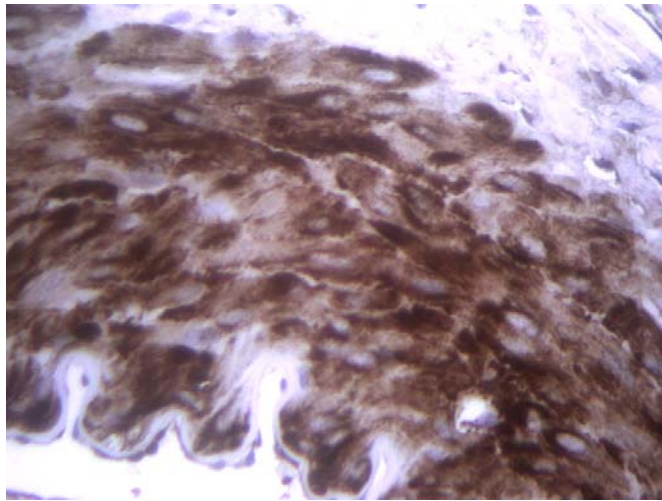




2a



2b



2c

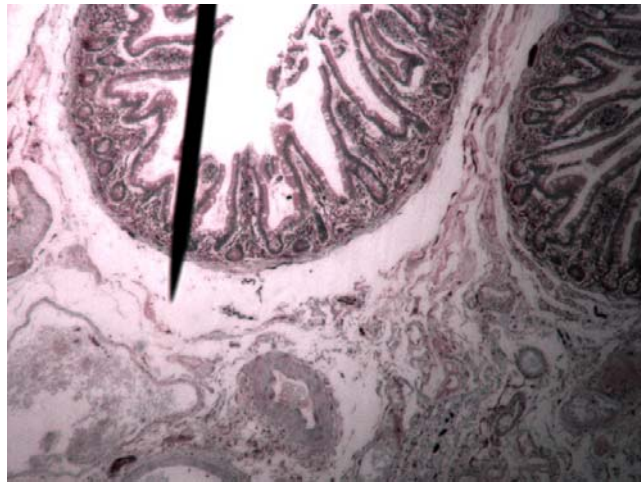
Fuente: el autor. Noviembre de 2012

**Foto 3.** Mucosa y submucosa de colon de conejo.

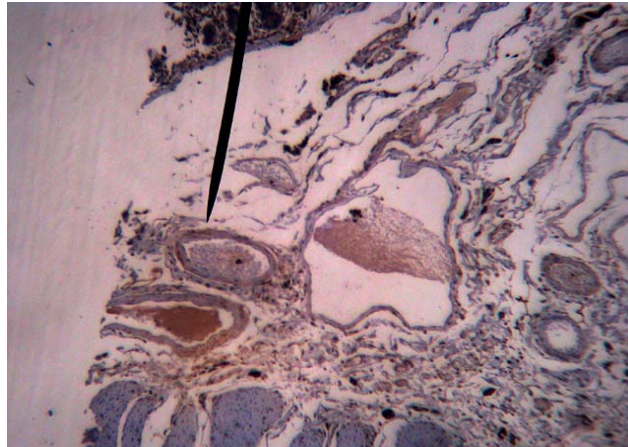
3a. Mucosa y submucosa de colon de *O. cuniculus*, que señala los vasos sanguíneos en la submucosa con inmunohistoquímica para CRBP-1 en concentración 1:100, y contrastada con hematoxilina en 5x.

3b. Acercamiento en submucosa de colon, que muestran los vasos sanguíneos con inmunohistoquímica para CRBP-1 contrastada con hematoxilina en 10x.

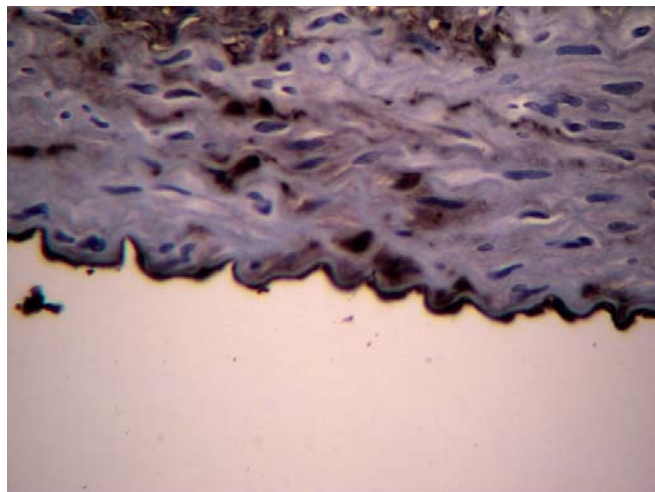
3c. Acercamiento en submucosa de colon, que muestra la túnica íntima del vaso sanguíneos con inmunohistoquímica para CRBP-1 contrastada con hematoxilina en 100x, se ven además de los VSC-S, también el endotelio vascular.



3a



3b



3c

*Fuente: el autor. Noviembre de 2012*

**Foto 4.** Carótida interna a la altura del seno carotídeo de *O.cuniculus* de 7 semanas de edad, con inmunohistoquímica para SMA-  $\alpha$  contrastada con hematoxilina.

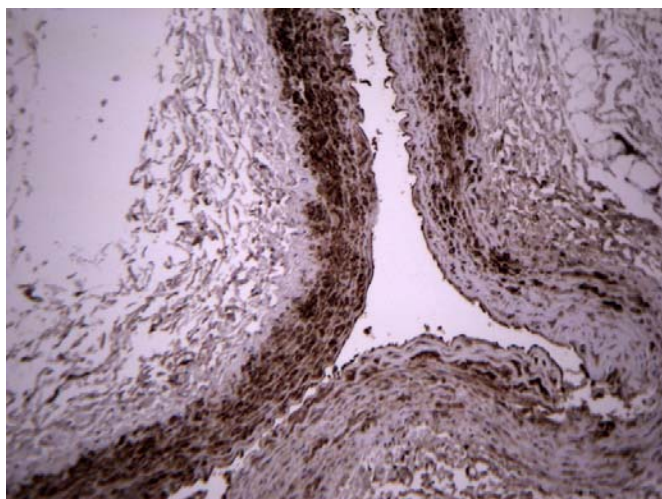
4a. 5x. Panorámica que muestra la distribución diferencial del inmunomarcaje predominantemente en la túnica media.

4b. 10x. Panorámica que revela el inmunomarcaje en la túnica adventicia.

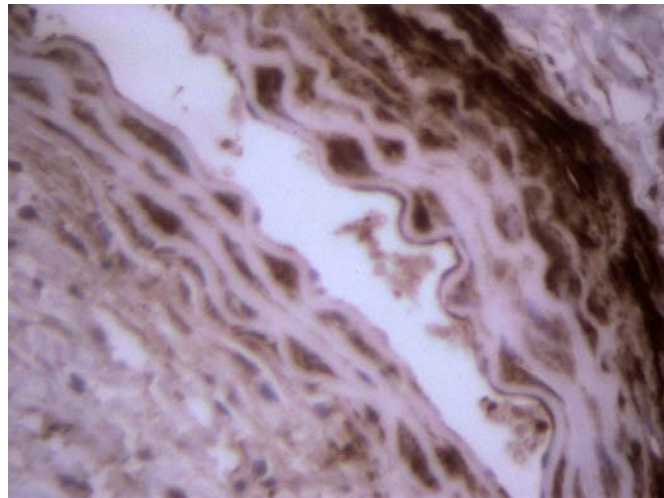
4c. 40x. Acercamiento mostrando la presencia de VSC-C en las tres tunicas vasculares. Nótese la marcada asimetría en el grosor de la túnica media vascular y distribución diferencial de VSC-C.



4a



4b



4c

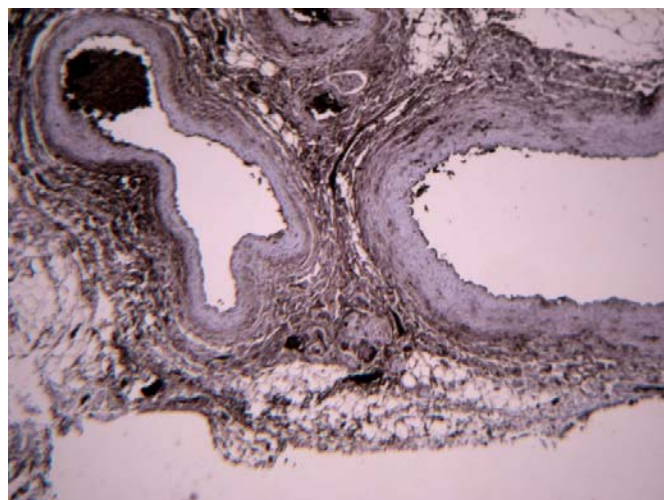
Fuente: El autor. Noviembre de 2012

**Foto 5.** Carótida interna a la altura del seno carotídeo de *O.cuniculus* de 7 semanas de edad, con inmunohistoquímica para CRBP-1 contrastada con hematoxilina

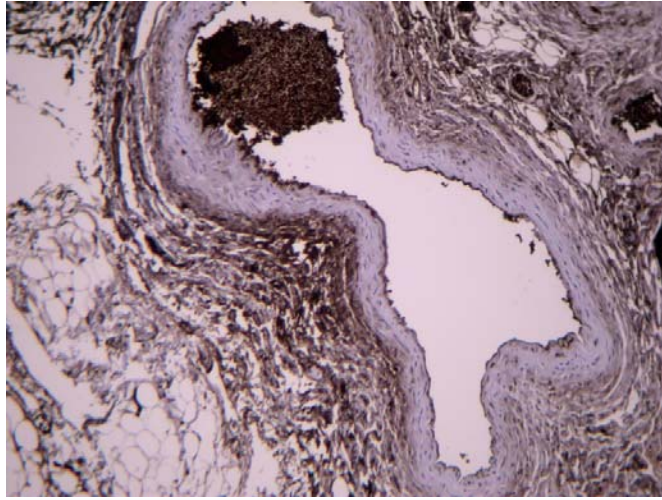
5a. 5x. Panorámica que muestra poco inmunomarcaje en las tres túnicas vasculares

5b. 10x. Panorámica con conspicuo inmunomarcaje túnica adventicia

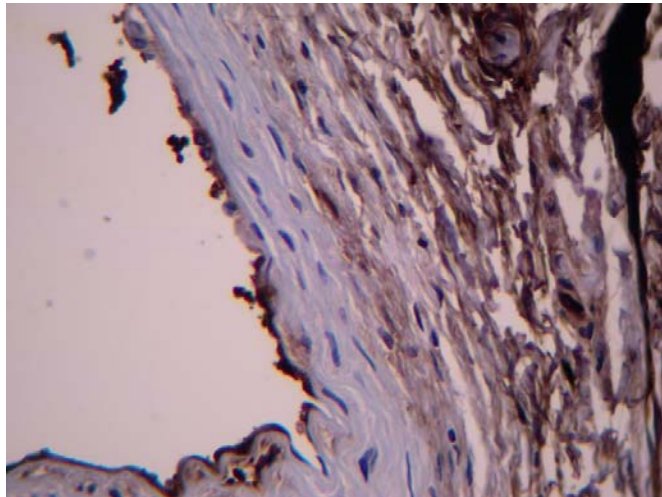
5c. 40x. Acercamiento que muestra exigua presencia de VSC-S en la túnica íntima y media, pero mayor en la adventicia.



5a



5b



5c

*Fuente: el autor. Noviembre de 2012*

**Tabla 1.** Cantidad de leiomiocitos vasculares contráctiles VSC-C inmunomarcados con SMA-  $\alpha$  y de leiomiocitos vasculares sintéticos VSC-S inmunomarcados con CRBP-1, en las tunicas vasculares de seno carotídeo en *O. cuniculus* de 7 semanas de edad

No. Del Animal	<b><i>O. Cuniculus</i> 7 semanas</b>					
	ÍNTIMA		MEDIA		ADVENTICIA	
	VSC-C	VSC-S	VSC-C	VSC-S	VSC-C	VSC-S
1	1	0	7	2	0	0
2	2	0	10	1	1	1
3	1	1	8	2	0	1
4	2	1	6	0	0	1
5	3	1	11	4	0	2
6	1	0	19	3	1	2
7	1	0	8	2	1	1
8	1	0	9	3	0	2
9	1	0	9	3	0	2
10	2	1	6	2	2	2
Sum	15	4	93	22	5	14
MEDIA	1,50	0,40	9,30	2,20	0,50	1,40
SD	0,71	0,52	3,77	1,14	0,71	0,70
Wilcoxon	W = 67, p <= 0.004587		W = 55, p <= 0.0001827		74.5, p <= 0.02334	
	HAY DIFERENCIA		HAY DIFERENCIA		HAY DIFERENCIA	

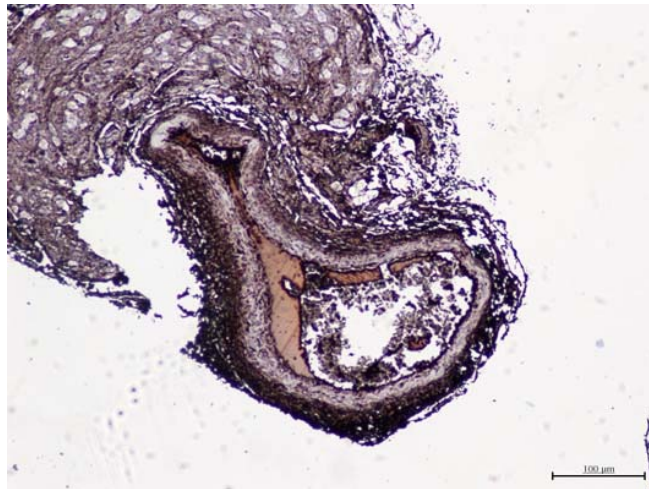
Fuente: el autor. Noviembre de 2012

**Foto 6.** Carótida interna a la altura del seno carotídeo de *O.cuniculus* de 104 semanas de edad, con inmunohistoquímica para SMA-  $\alpha$  contrastada con hematoxilina.

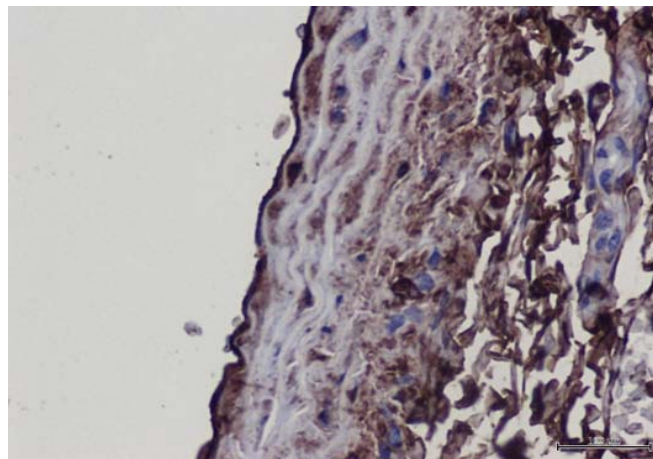
6a. 5x. Panorámica que muestra la distribución diferencial del inmunomarcaje en las tres tunicas vasculares

6b. 10x. Panorámica que muestra la presencia de VSC-C en las tres tunicas vasculares.

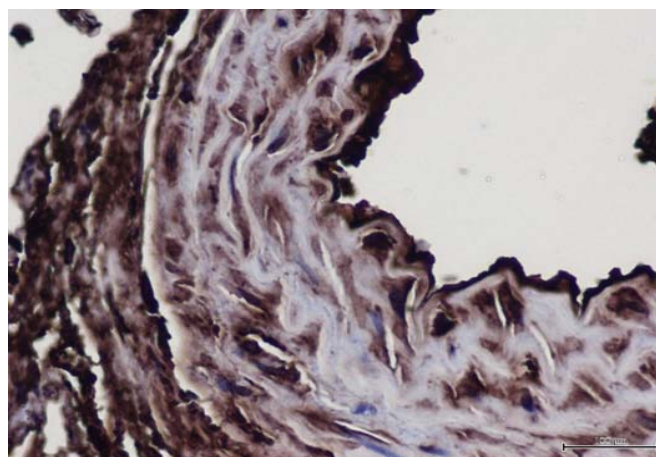
6c. 40x Acercamiento que revela el inmunomarcaje predominantemente en la túnica íntima y adventicia.



6a



6b



6c

Fuente: El autor. Noviembre de 2012

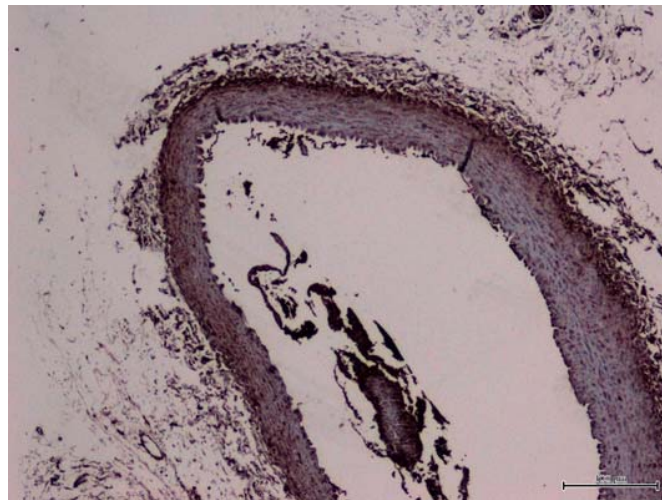


**Foto 7.** Carótida interna a la altura del seno carotídeo de *O.cuniculus* de 104 semanas de edad, con inmunohistoquímica para CRBP-1 contrastada con hematoxilina.

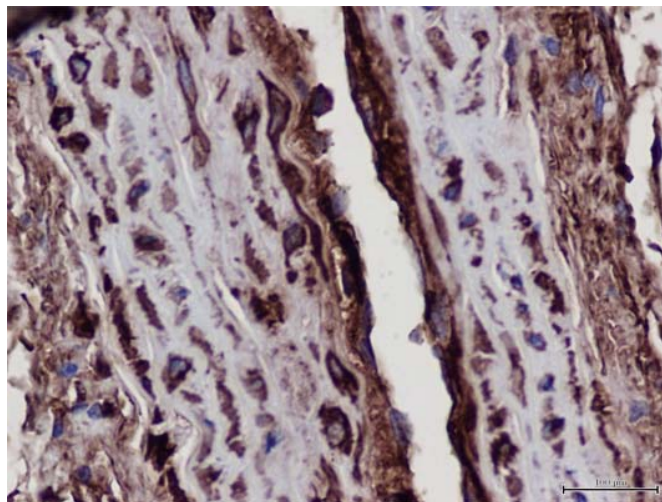
7a. 5x. Panorámica que muestra el inmunomarcaje en las tres tunicas vasculares

7b. 10x. Panorámica con conspicuo inmunomarcaje predominando en túnica íntima y media

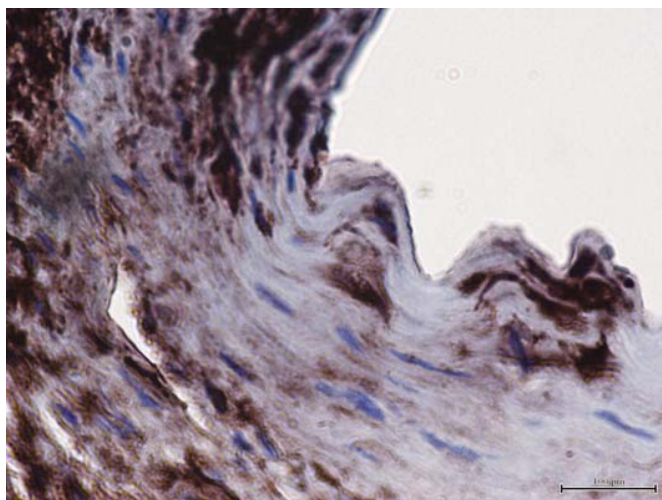
7c. 40x. Acercamiento que muestra la presencia de VSC-S en túnica íntima y media.



7a



7b



7c

Fuente: El autor. Noviembre de 2012

**Tabla 2.** Cantidad de leiomiocitos vasculares contráctiles VSC-C inmunomarcados con SMA- $\alpha$  y de leiomiocitos vasculares sintéticos VSC-S inmunomarcados con CRBP-1, en las tunicas vasculares de seno carotídeo en *O. cuniculus* de 104 semanas de edad.

<b><i>O. Cuniculus</i> 104 semanas</b>						
		ÍNTIMA		MEDIA		ADVENTICIA
No. Animal	VSC-C	VSC-S	VSC-C	VSC-S	VSC-C	VSC-S
1	3	5	10	3	0	1
2	2	6	8	3	0	1
3	3	7	7	2	2	1
4	4	3	11	1	1	1
5	5	3	10	2	1	1
6	3	4	8	3	1	2
7	2	6	7	4	0	0
8	2	6	7	4	0	0
9	2	6	9	3	0	0
10	2	5	7	4	1	1
Sum	28	51	84	29	6	8
MEDIA	2,80	5,10	8,40	2,90	0,60	0,80
SD	1,03	1,37	1,51	0,99	0,70	0,63
Wilcoxon	W=72, p <= 0.01402		W=55, p <= 0.000182		W=121, p <= 0.7427	
	HAY DIFERENCIA		HAY DIFERENCIA		NO HAY DIFERENCIA	

Fuente: el autor. Noviembre de 2012

**Tabla 3.** Test de Wilcoxon de leiomiocitos vasculares contráctiles VSC-C inmunomarcados con SMA-  $\alpha$  en cada una las túnicas vasculares de seno carotídeo en *O. cuniculus* de 7 semanas de edad y de 104 semanas de edad.

<b>VSC-C en <i>O. Cuniculus</i></b>						
<b>7 semanas y 104 semanas</b>						
	ÍNTIMA		MEDIA		ADVENTICIA	
	7 semanas	104 semanas	7 semanas	104 semanas	7 semanas	104 semanas
No. Animal						
1	1	3	7	10	0	0
2	2	2	10	8	1	0
3	1	3	8	7	0	2
4	2	4	6	11	0	1
5	3	5	11	10	0	1
6	1	3	19	8	1	1
7	1	2	8	7	1	0
8	1	2	9	7	0	0
9	1	2	9	9	0	0
10	2	2	6	7	2	1
<b>Sum</b>	<b>15</b>	<b>28</b>	<b>93</b>	<b>84</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>MEDIA</b>	<b>1,50</b>	<b>2,80</b>	<b>9,30</b>	<b>8,40</b>	<b>0,50</b>	<b>0,60</b>
<b>SD</b>	<b>0,71</b>	<b>1,03</b>	<b>3,77</b>	<b>1,51</b>	<b>0,71</b>	<b>0,70</b>
<b>WILCOXON</b>	W = 69, p<= 0.007285		W = 102.5, p<= 0.8798		W = 121.5, p<= 0.7676	
	<b>HAY DIFERENCIA</b>		<b>NO HAY DIFERENCIA</b>		<b>NO HAY DIFERENCIA</b>	

Fuente: el autor. Noviembre de 2012

**Tabla 4.** Test de Wilcoxon de leiomiocitos vasculares sintéticos VSC-S inmunomarcados con CRBP-1, en cada una de las tunicas vasculares de seno carotídeo en *O. cuniculus* de 7 semanas de edad y de 104 semanas de edad.

VSC-S en <i>O. Cuniculus</i>						
7 y 104 semanas						
	ÍNTIMA		MEDIA		ADVENTICIA	
	7 semanas	104 semanas	7 semanas	104 semanas	7 semanas	104 semanas
No. Animal						
1	0	5	2	3	0	0
2	0	6	1	3	1	0
3	1	7	2	2	1	2
4	1	3	0	1	1	2
5	1	3	4	2	2	1
6	0	4	3	3	2	2
7	0	6	2	4	1	0
8	0	6	3	4	2	0
9	0	6	3	3	2	0
10	1	5	2	4	2	1
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>51</b>	<b>22</b>	<b>29</b>	<b>14</b>	<b>8</b>
Sum	0,40	5,10	2,20	2,90	1,40	0,80
<b>MEDIA</b>	<b>0,52</b>	<b>1,37</b>	<b>1,14</b>	<b>0,99</b>	<b>0,70</b>	<b>0,92</b>
SD	1,37	0,52	1,14	1,48	0,92	0,70
<b>WILCOXON</b>	W=55, p<=0.0001827		W=87, p<=0.0859		W=86, p<=0.102	
	HAY DIFERENCIA		HAY DIFERENCIA		NO HAY DIFERENCIA	

Fuente: el autor. Noviembre de 2012

**Tabla 5.** Test de Wilcoxon para densidad celular en las túnica de seno carotídeo de *O. cuniculus* de 7 semanas de edad y 104 semanas de edad.

<b>Densidad celular en seno carotídeo de <i>O.Cuniculus</i></b>						
	<b>ÍNTIMA</b>		<b>MEDIA</b>		<b>ADVENTICIA</b>	
	7	120	7	104	7	104
	semanas	semanas	semanas	semanas	semanas	semanas
Longitud	5	9,3	22,4	36,2	10,8	11,3
SD	0,82	1,70	6,47	3,55	1,87	2,00
Número de Células	1	3	5	8	2	2
Densidad	0,200	0,323	0,313	0,221	0,185	0,17
Wilcoxon	W = 69, p <= 0.095		W = 75, p <= 0.0152		W = 102.5, p <= 0.78	
	HAY DIFERENCIA		HAY DIFERENCIA		NO HAY DIFERENCIA	

Fuente: el autor. Noviembre de 2012

## 8. Discusión

Los leiomiocitos contráctiles vasculares o VSC constitutivamente tienen en su citoplasma la expresión de SMA-  $\alpha$ <sup>84</sup>, así como de CRBP-1<sup>85</sup> en los modelos murinos<sup>86</sup>, es necesario demostrar en este estudio la estandarización de la concentración de anticuerpos con modelo el animal lagomorfo, dado que los anticuerpos bajo la concentración indicada están desarrollados por la casa fabricante, en este caso NOVOCASTRA<sup>87</sup>, usa antígenos SMA-  $\alpha$  y CRBP-1 de leiomiocitos vasculares de murinos.

En este sentido, la estandarización ha podido demostrar los subtipos de leiomiocitos VSC-C y VSC-S, en la túnica media de vasos sanguíneos de *O. cuniculus*, con la concentración 1:100 respectivamente (Foto 2. 2c, Foto 3. 3c). Adicionalmente, en esa concentración se reveló inmunomarcaje para CRBP-1 en células endoteliales, tanto citoplasmático como nuclear, expresión así reportada de manera normal, pero en el endotelio de cerebro y barrera hematoencefálica de humanos y murinos, justificados allí por su rol ligador, transportador y traslocador de retinoles<sup>88</sup>; así los hallazgos, esta función transportadora y traslocadora de retinoles podría asociarse para el endotelio de lagomorfo.

“In Vitro” los estudios de aislamiento de VSC en murinos hechos por Villaschi y Col en 1994, lograron demostrar diferencialmente VSC-S restringidos a la túnica íntima aórtica y

---

<sup>84</sup> DE CASTRO, Op. cit.

<sup>85</sup> NISHIDA, Op. cit.

<sup>86</sup> GABBIANI, Op.cit.

<sup>87</sup> NOVOCASTRA. Inmunohistochemistry and In Situ Hibridation. Product Range 2011/2012. Catalog LEICA Microsystem. www. leica-microsystem.com

<sup>88</sup> MC.DONALD, P.N., and BOK, D.T. Localization of cellular retinol-binding protein and retinol-binding protein in cells comprising the blood-brain barrier of rat. and human. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990. vol. 87, p.4265-4269

VSC-C restringidos a la túnica del mismo vaso<sup>89</sup>. Bochaton- Piallat y Col (1996) "In Vivo" también en murinos, describen VSC-C y VSC-S en túnica media aórtica, usando los mismos marcadores SMA-  $\alpha$  y CRBP-1, pero restringidos únicamente a túnica media; solo se han reportado las dos poblaciones en túnica íntima aórtica, pero de manera patológica por lesión endotelial<sup>90</sup>.

Digitando en la base de Datos PUBmed los términos cruzados MeSH, vascular Smooth Cell Types –Rabbit Carotid Sinus Aging, no aparecen reportes, con lo que se confirma a la fecha de entrega de este trabajo, Noviembre de 2012, que no hay descripciones de los subtipos de VSC en seno carotídeo en esta especie, con distribución en túnica íntima y media vascular, lo cual podría constituir este hallazgo en el primer reporte en la literatura para *O. cuniculus*, usando los marcadores SMA-  $\alpha$  y CRBP-1.

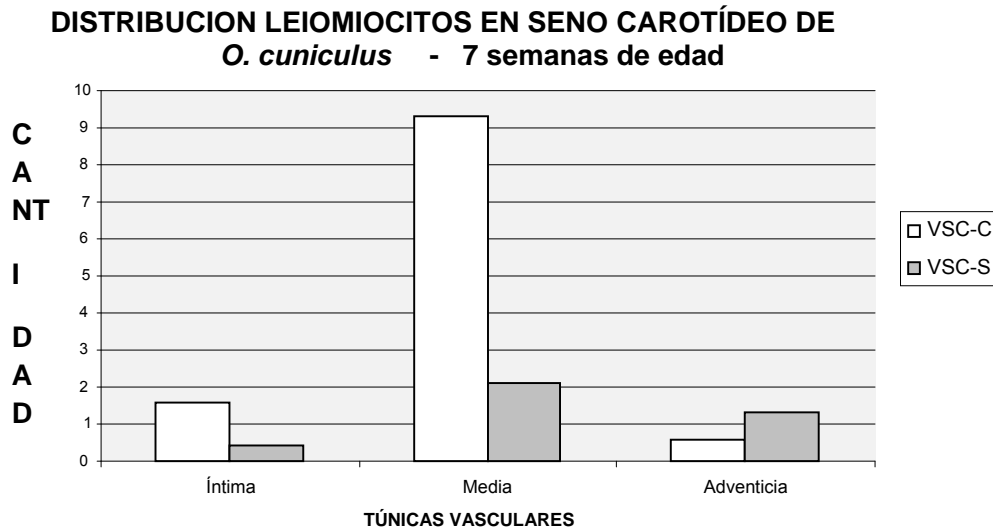
Luego de estandarizado, el inmunomarcaje de SMA-  $\alpha$  y CRBP-1 en el seno carotídeo de *O. cuniculus* para esta tesis de grado, se pudo establecer que en los conejos de 7 semanas de edad hay VSC-C y VSC-S en las tres túnicas vasculares, con diferencias de cantidad estadísticas significativas al Test de Wilcoxon (Tabla 1.  $P < 0,1$ ) (Foto 4 y Foto 5), siendo la población mayoritaria los VSC-C en la túnica íntima y media, pero siendo mayoritaria los VSC-S en la túnica adventicia (Figura 2).

---

<sup>89</sup> [VILLASCHI, S.](#), [NICOSIA, R.F.](#), and [SMITH, M.R.](#) Isolation of a morphologically and functionally distinct smooth muscle cell type from the íntimal aspect of the normal rat aorta. Evidence for smooth muscle cell heterogeneity. [In Vitro Cell Dev Biol Anim.](#) 1994. vol. 30A, no. 9, p.589-95

<sup>90</sup> [BOCHATON-PIALLAT, M.L.](#), *et al.* Cultured arterial smooth muscle cells maintain distinct phenotypes when implanted into carotid artery. [Arterioscler Thromb Vasc Biol.](#) 2001. vol. 21, no. 6, p.949-54

**Figura 2.** Distribución diferencial con cantidad de VSC-C y VSC-S en las túnicas vasculares de seno carotídeo de *O. cuniculus* de 7 semanas de edad.



Fuente: el autor. Noviembre de 2012

De la misma forma, previa estandarización del inmunomarcaje de SMA-  $\alpha$  y CRBP-1 en el seno carotídeo, se pudo establecer en *O. cuniculus* de 104 semanas de edad, hay presencia de VSC-C y VSC-S en las tres túnicas vasculares (Foto 6 y Foto 7), pero con diferencias estadísticamente significativas, en túnica íntima y media establecidas con el Test de Wilcoxon (Tabla 2.  $P < 0,1$ ); conformando la población mayoritaria los VSC-S en las túnicas reseñadas (Figura 3).

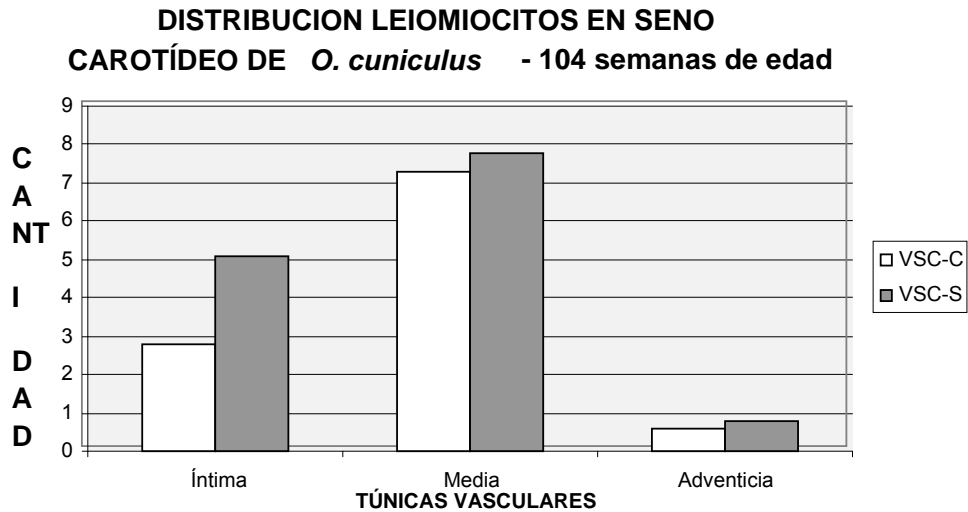
El aumento de los VSC-S en túnica íntima de los animales de 104 semanas de edad, pueden esta justificado por los estudios "In Vitro" hechos en murinos por Bochaton-Piallat y Col (1993) que reportan cómo hay perdida del marcador en SMA-  $\alpha$  en citoesqueleto, en la medida que se envejece la célula muscular lisa dentro del cultivo, convirtiéndose los VSC-C en VSC-S<sup>91</sup>, conversión que en la biología del envejecimiento

<sup>91</sup> BOCHATON-PIALLAT, M.L., *et al.* Age influences the replicative activity and the differentiation features of cultured rat aortic smooth muscle cell populations and clones. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1993. vol. 13, p.1449-1455



celular de los VSC “in Vitro”, se relaciona con la promoción de supervivencia y ha sido demostrado también “In Vitro” en el modelo murino<sup>92</sup>, lagomorfo<sup>93</sup> y humano<sup>94</sup>.

**Figura 3.** Distribución diferencial con cantidad de VSC-C y VSC-S en las tunicas vasculares de seno carotídeo de *O. cuniculus* de 104 semanas de edad.



*Fuente: el autor. Noviembre de 2012*

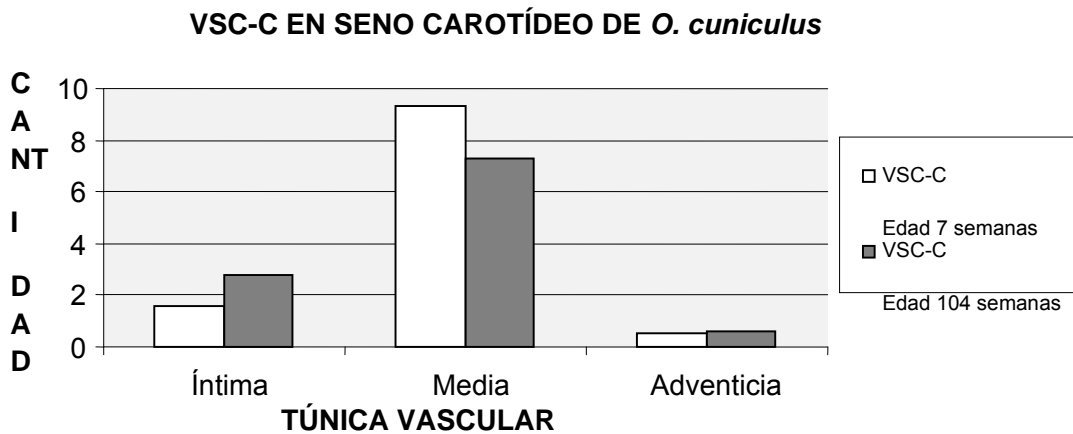
Al comparar las poblaciones de VSC-C de *O. cuniculus* de 7 semanas y 104 semanas de edad por cada túnica vascular del seno carotídeo (Figura 4), se pudo evidenciar aumento de este tipo de leiomiocito en los conejos envejecidos con diferencias significativas restringidas a la túnica íntima en aquellos ejemplares de 7 semanas de edad (Tabla 3.  $p < 0,1$ ).

<sup>92</sup> LUNDBERG. Op.cit.

<sup>93</sup> ROY. Op.cit.

<sup>94</sup> MII. Op.cit.

**Figura 4.** Distribución diferencial con cantidad de VSC- C en las tunicas vasculares de seno carotídeo de *O. cuniculus* de 7 y 104 semanas de edad

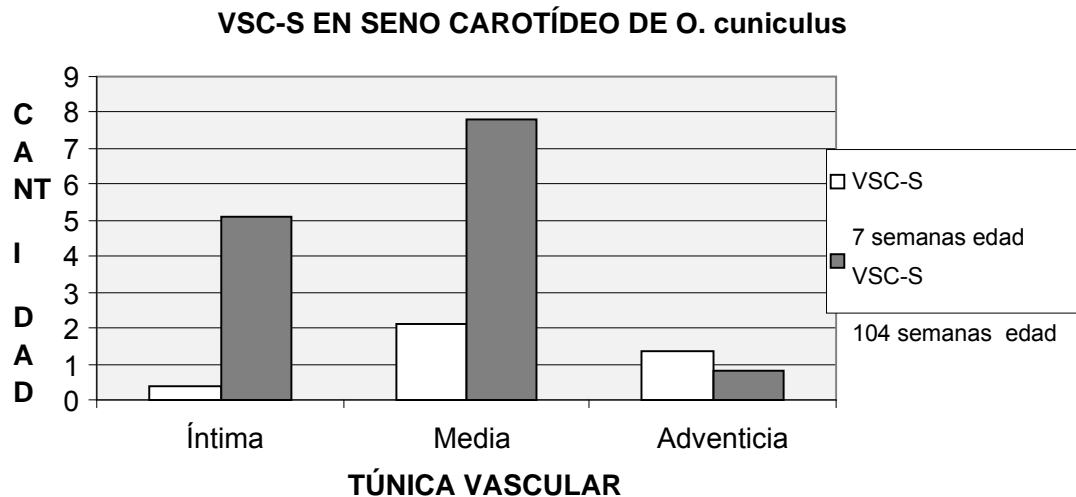


Fuente: el autor. Noviembre de 2012

Por su parte al comparar las poblaciones de VSC-S de los *O. cuniculus* de 7 y 104 semanas de edad por cada túnica vascular del seno carotídeo, se pudo evidenciar un aumento de este tipo de leiomiocitos en la túnica íntima y media, con diferencias significativas a favor de los ejemplares de 104 semanas de edad (Tabla 4.  $p < 0,1$ ) (Figura 4) En el escenario patológico, encontramos que son cambios que también están descritos pero por previa injuria endotelial con balón carotídeo <sup>95</sup>.

<sup>95</sup> [EGHBALIEH](#), S.D.D., *et al.* Age-Related Neointimal Hyperplasia Is Associated With Monocyte Infiltration After Balloon Angioplasty. Gerontol A Biol Sci Med Sci 2012. vol. 67A, no. 2, p.109-117

**Figura 5.** Distribución diferencial con cantidad de VSC-S en las tunicas vasculares de seno carotídeo de *O. cuniculus* de 7 y 104 semanas de edad.



*Fuente: el autor. Noviembre de 2012*

Con respecto a la densidad celular por cada túnica vascular del seno carotídeo en *O. cuniculus* de 7 y 104 semanas de edad (Figura 5), se pudo observar en la túnica íntima de aquellos animales de 104 semanas, hay un aumento de la densidad en túnica íntima estadísticamente significativa (Tabla 5.  $p < 0,1$ ), es decir, mayor cantidad de células por sección; este aumento de la densidad llamado hiperplasia mioíntimal, es demostrada experimentalmente en aortas de murinos sometidas al aumento de tensión en la pared vascular<sup>96</sup>.

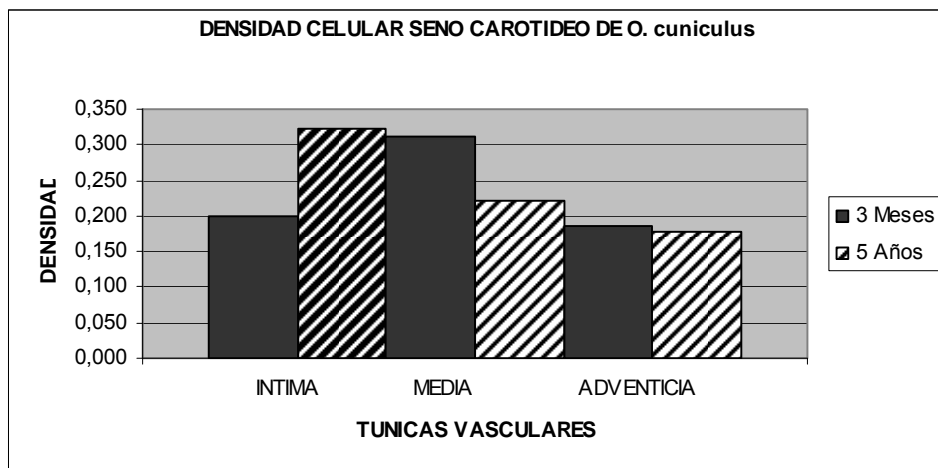
Este hallazgo junto con el de Hariri y Col (1986) en aortas envejecidas también de murinos, pero “in vitro”, consistente en la demostración de un “estatus” de proliferación mioíntimal de VSC por hallarlos en fase de ciclo celular “S”<sup>97</sup>, se correlaciona con los hallazgos de esta tesis de grado, que demuestran “in situ” mayor cantidad de VSC-S en senos carotídeo de conejos envejecidos, cuya presencia se revela con el inmunomarcaje

<sup>96</sup> KOCHER, O., *et al.* Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions and experimental íntimal thickening. *Lab Invest.* 1984. vol. 50, p. 645–652

<sup>97</sup> HARIRI, R.J., *et al.* Aging and arteriosclerosis: L development of mioíntimal hyperplasia after endothelial injury. *J Exp Med* 1986. vol 164, p.1171-8.

CRBP-1, en la túnica íntima de los conejos envejecidos (Figura 4 y Foto 7); y que son células en la literatura reconocidamente proliferantes<sup>98,99</sup>.

**Figura 6.** Densidad de VSC- C y VSC-S en las túnicas vasculares de seno carotídeo de *O. cuniculus* de 7 semanas y 104 semanas de edad.



Fuente: el autor. Noviembre de 2012

En la densidad celular de la túnica media del seno carotídeo en *O. cuniculus* de 7 y 104 semanas de edad (Figura 6), se pudo observar en el grupo envejecido menor densidad celular con diferencias estadísticamente significativa (Tabla 5.  $p < 0,1$ ), esto es menor cantidad de células por sección.

Este hallazgo se considera coherente con el predominio de VSC-S en túnica media del seno carotídeo de los animales envejecidos (Figura 4), y que plantea la literatura como “cambio esperado” por necesidades de aumento de matriz extracelular para remodelación vascular, en respuesta a fuerzas hemodinámicas dadas en función del tiempo<sup>100 101</sup>.

<sup>98</sup> OWENS GK. Op.cit.

<sup>99</sup> WALKER-CAPRIOLOGLIO HM. Op.cit.

<sup>100</sup> QUINTAVALLE, M., et al. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. J Cell Biol 2010;189:13-22

En este trabajo de grado, llama la atención cómo en el grupo de los modelos animales de 104 semanas de edad, aumenta cantidad de células VSC-S en túnica íntima y media del seno carotídeo; pero con respecto a la densidad celular, esta es mayor en túnica íntima y paralelamente menor túnica media (Figura 5), dicho hallazgo aporta experimentalmente a la disyuntiva sobre la movilidad de los VSC al envejecimiento, argumentando a favor de que los VSC-S envejecidos que según exigencias funcionales de su entorno, definen sus patrones de expresión génica en dirección VSC- C o VSC-S<sup>102,103</sup>. Así, se podría hipotetizar que en el modelo lagomorfo para el seno carotídeo en el envejecimiento, en la túnica media se lleva a la desdiferenciación del VSC-C de función contráctil a favor del linaje VSC-S de función sintética y proliferante; transformación que por lo tanto lleva a una disminución de la densidad celular en túnica media y aumento en túnica íntima. La posible transformación propuesta, es reconocida en la literatura y demostrada “in Vitro” por activación del factor de transcripción de la familia dedos de zinc GATA-6<sup>104</sup> <sup>105</sup> que induce disminución de la expresión de proteínas marcadoras de leiomiocitos musculares contráctiles SMA-  $\alpha$ , desdiferenciándola y aumentando la expresión del marcador CRBP-1) mientras envejecen<sup>106</sup> <sup>107</sup>.

---

<sup>101</sup> JACOB, M.P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003. Vol 57, p.195–202

<sup>102</sup> [SHANAHAN](#), Catherine M., [WEISSBERG](#), Peter L. Smooth Muscle Cell Heterogeneity Patterns of Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro and In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.1998. vol.18, p. 333-338

<sup>103</sup> JOSHI, Sachindra R., *et al.* MicroRNA Regulation of Smooth Muscle Phenotype. *Mol Cell Pharmacol* 2012. vol.4, no.1, p.1-16

<sup>104</sup> NISHIDA, W. Op.cit.

<sup>105</sup> LEPORE, John J. Op.cit.

<sup>106</sup> MORROW, David. Op.cit.

<sup>107</sup> NISHIDA, W. Op.cit.



## 9. Conclusiones y recomendaciones

En las tres tnicas vasculares del seno carotídeo de conejo *O. cuniculus* se pueden fenotipificar con inmunohistoquímica SMA-  $\alpha$ - células musculares vasculares contráctiles o VSC-C y con CRBP-1 células musculares vasculares snteticas /proliferantes o VSC-S

En el seno carotídeo de conejo *O. cuniculus* con el envejecimiento, hay un aumento de las células musculares vasculares snteticas en las túnica íntima y media.

En el seno carotídeo de conejo *O. cuniculus* con el envejecimiento, hay un aumento de la densidad celular en la túnica íntima y disminución de densidad celular en túnica media a expensas de la cantidad de VSC.-S





## Bibliografía

MOORE R.L. A study of the hering breuer reflex. J. Exp. Med. 1927. p.46, 819

ABDALA, A.P. *et al.* Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. J Physiol. 2012. 590 (Pt 17): p.4269-77

ABDEL-MAGIED, E.M. Ultrastructure of carotid baroreceptors in the goat. Tissue And Cell. 1992. vol. 24, no. 5, p.681-687

KHAMAS, Abdul Wael Hameed *et al.* Terminal branches of the common carotid artery in mule with emphasis on the carotid body and carotid sinus. Veterinarski Arhiv. 2002. vol. 72, no.1, p.1-10

ALTIMIRAS, J., FRANKLIN, C,E., and AXELSSON, M. Relationships between blood pressure and heart rate in the saltwater crocodile *Crocodylus porosus*. J Exp Biol.1998. vol. 201, p.2235–2242

BAGSHAW, R. Evaluation of cardiovascular baroreceptor control. Biol. Rev. 1985. vol. 60, p.121–162

BALLS M, *et al.* The Three Rs: the way forward. Alternatives to Laboratory Animals 1995. Vol 23, p. 838-866

BERGER Y.P.J., EVANS, B.K., and SMITH, D.G. Localization of baroreceptors and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in the lizard trachydosaurus rugosus. J. exp. Biol. 1980. vol. 86, p.197-209.

En: <http://jeb.biologists.org/content/86/1/197.full.pdf>

BAKRIS, G.L., et al. Baroreflex activation therapy provides durable benefit in patients with resistant hypertension: results of long-term follow-up in the Rheos Pivotal Trial.. J Am Soc Hypertens. Mar-Apr 2012. vol. 6, no. 2, p.152-8

BARKER, S.G.E., et al. The vasa vasorum of the rabbit carotid artery. *Anat.* 1992. vol. 180, p. 225-231

BERGER, B.K.E., and SMITH, G. Localization of baroreceptors and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in the lizard *trachydosaurus rugosus*. *J. Exp. Biol.* 1980. vol. 86, p. 197-209. En <http://jeb.biologists.org/content/86/1/197.full.pdf>

BIAA, D., et al. El músculo liso vascular de las grandes arterias: ¿sitio de control local de la función de amortiguamiento arterial. Rev Esp Cardiol. 2003. vol. 56, no. 12, p.1202-9

BLOMGREN, Göktürk. A novel method for quantification of the folding of elastic laminae in elastic arteries. Micron. 2008. vol. 39, no. 5, p.623-630

BOCHATON-PIALLAT, M.L., et al. Cultured arterial smooth muscle cells maintain distinct phenotypes when implanted into carotid artery. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001. vol. 21, no. 6, p.949-54

BOCHATON-PIALLAT, M.L., et al. Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones: implications for the development of experimental íntimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996. vol. 16, p.815–820

BOCHATON-PIALLAT, M.L., et al. Age influences the replicative activity and the differentiation features of cultured rat aortic smooth muscle cell populations and clones. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1993. vol. 13, p.1449-1455

BOLZON, I.B.J., and CHEUNG, D.W. Isolation and Characterization of Single Vascular Smooth Muscle Cells From Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 1989. vol. 14, p.137-144

BOSS, J., and GREEN, J.H. The Histology of the Common Carotid Baroreceptor Areas of the Cat.. *Circulation Research* 1956. vol. 4, p.12-17

BOYD, J.D. Nerve supply to the branchial arch arteries of vertebrates. *J. Anat.* 1936. vol. 71, p. 157-158

BURNHAM, K.P., ANDERSON, D.R., and LAAKE, J.L. Estimation of density from line transect sampling of biological populations. *Wildl. Monograph* 1980. vol. 72, p.1-202

CERONI, A., et al. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol.* Jun 2009. vol. 94, no, p.630-40

CROSSLEY, D.A., HICKS, J.W., and ALTIMIRAS, J. Ontogeny of baroreflex control in the American alligator *Alligator mississippiensis*. *The Journal of Experimental Biology* 2003. vol. 206, p.895-2902

DE CASTRO, Fernando. Towards the sensory nature of the carotid body: Hering, De Castro and Heymans. Edited by: Javier De Felipe. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2009. vol. 3, no. 23, p.1-11.

DE CASTRO, Fernando. Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères. Nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum. *Trav. Lab. Rech. Biol* 1928. vol. 25, p.331–380

EGHBALIEH, S.D.D., et al. Age-Related Neointimal Hyperplasia Is Associated With Monocyte Infiltration After Balloon Angioplasty. *Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012. vol. 67A, no. 2, p.109-117

ENNINGS, B.L., and DONALD, J.A., Neurally-derived nitric oxide regulates vascular tone in pulmonary and cutaneous arteries of the toad, *Bufo marinus*. *JAm J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008. vol. 295, no. R1640–R1646.

En: <http://ajprequ.physiology.org/content/295/5/R1640.full.pdf>

FARRELL, A.P. Cardiovascular changes in the lingcod (*Ophiodon elongatus*) following adrenergic and cholinergic drug infusions. *J. Exp. Biol.* 1981. vol. 91, p.293-305

FRID, M.G., *et al.* changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin, *va Dev. Biol.* 1992. vol. 153, p.185–193

GABBIANI, G., *et al.* Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981. vol. 78, p.298–302

GENNARO, Giuseppa, *et al.* Role of p44/p42 MAP Kinase in the Age-Dependent Increase in Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointimal Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003. vol. 23, p.204-210.

En: <http://atvb.ahajournals.org/content/23/2/204.full.pdf>

GEORGAKOPOULOS, D., *et al.* Effects of electrical stimulation of the carotid sinus baroreflex using the Rheos device on ventricular-vascular coupling and myocardial efficiency assessed by pressure-volume relations in non-vagotomized anesthetized dogs. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009 p.2025-9

GIMONA, M., *et al.* Small, Calponin and SM 22 isoforms in avian and mammalian smooth muscle. Absence of phosphorylation in vivo. *J. Biochem.* 1992. vol. 205, p.1067–1075

HANSEN, J.T. Morphology of the carotid sinus wall in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Anat Rec.* 1987 Aug. vol. 218, no. 4, p.426-33

HARIRI, R.J., *et al.* Aging and arteriosclerosis: L development of myointimal hyperplasia after endothelial injury. *J Exp Med* 1986. vol. 164, p.1171-8

JACOB, M.P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003. vol. 57, p.195–202

JH KUDO, H., KATO, A., HIROSE, S. Fluorescence Visualization of Branchial Collagen Columns Embraced by Pillar Cells. *Cytochem* 2007. vol. 55, p.57. En: <http://jhc.sagepub.com/content/55/1/57.full.pdf>

JONES, R.D, MILSOM W.K. Peripheral receptors affecting breathing and cardiovascular function in non-mammalian vertebrates. *J. exp. Biol.* 1982. vol. 100, p.59-91

JOSHI, Sachindra R., *et al.* MicroRNA Regulation of Smooth Muscle Phenotype. *Mol Cell Pharmacol* 2012. vol.4, no.1, p.1-16

KAMIYA, A., *et al.* Closed-loop spontaneous baroreflex transfer function is inappropriate for system identification of neural arc but partly accurate for peripheral arc: predictability analysis. *J Physiol.* Apr 1 2011. vol. 589, no. 7, p.1769-90

KNEUBIL, M.C., *et al.* Sequential histomorphometric study of the left internal thoracic artery *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006. vol. 21, no. 4, p. 371-376

KOCHER, O., *et al.* Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions and experimental íntimal thickening. *Lab Invest.* 1984. vol. 50, p.645–652

LATARO, R.M., *et al.* Baroreceptor and chemoreceptor contributions to the hypertensive response to bilateral carotid occlusion in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Dec 2010. vol. 299, no. 6, p.H1990-5

LEPORE, John J., *et al.* GATA-6 Regulates Genes Promoting Synthetic Functions in Vascular Smooth Muscle Cells *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005. vol. 25, p.1-6

LOHMEIER, T.E., et al. Sustained suppression of sympathetic activity and arterial pressure during chronic activation of the carotid baroreflex. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Aug 2010. vol. 299, no. 2, p.H402-9

LUCITTI, J.L., and HEDRICK, M.S. Characterization of baroreflex gain in the domestic pigeon (*Columba livia*). *Comp Biochem Physiol.* 2006. vol.143, part A, p.103–111  
En <http://www.sci.csueastbay.edu/~mhedrick/Lucitti.Hedrick.CBP.2006.pdf>

LUNDBERG, Martha S., et al. J Regulation of Vascular Smooth Muscle Migration by Mitogen-activated Protein Kinase and Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Signaling Pathways. *Mol Cell Cardiol* 30. 1998. p.2377–2389

MC.CAFFREY, Timothy A., et al. The Increased Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells Isolated from Old Rats Is Associated with Increased Platelet-derived Growth Factor-like Activit. *Exp. MED.* 1988. vol. 167, p.163-174. En <http://jem.rupress.org/content/167/1/163.long>

MC.DONALD, P.N., and BOK, D.T. Localization of cellular retinol-binding protein and retinol-binding protein in cells comprising the blood-brain barrier of rat. and human. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990. vol. 87, p.4265-4269

MIL, S., et al. Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells. Am J Physiol. 1996 Jan. vol. 270, no. 1 pt 2, p.H142-50

MISTRY, A.C., et al. FHL5, a novel actin-binding protein, is highly expressed in eel gill pillar cells and responds to wall tension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004. vol. 287, p.R1141–1154

MORROW, David, et al. Notch and Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. *Circ. Res.* 2008. vol. 103, p.1370-1382

NAGAI, R., *et al.* Identification of two types of Smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J. Biol. Chem.* 1989. vol. 264, p.9734–9737

NILSSON, S., and SUNDIN, L. Gill blood flow control. *Comp Biochem Physiol* 1998. vol. 119, p.137-147

NISHIDA, W., *et al.* A triad of serum response factor and the GATA and NK families governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes. *J Biol Chem* 2002. vol. 277, p.7308–7317

NOVOCASTRA. Immunohistochemistry and In Situ Hybridation. Product Range 2011/2012. Catalog LEICA Microsystem. [www.leica-microsystem.com](http://www.leica-microsystem.com)

OWENS, G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995, vol. 75, p.487–517

OWENS, G.K., *et al.* Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004. vol. 84, p.767-801

PARCHAMI, A., FATAHIAN DEHKORDI, R.A., and DERAKHSHAN, A. Comparative histomorphometric study of the common carotid artery and its terminal branches in sheep and goats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2009. vol. 12, no 3, p.165–170

PORRECA, E., *et al.* Protein kinase C pathway and proliferative response of aged and young rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1993. vol. 104, p.137–145

QUINTAVALLE, M., *et al.* MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J Cell Biol* 2010;189:13-22

REES, P.M. Electron microscopical observations on the architecture of the carotid arterial walls, with special reference to the sinus portion. *J. Anat.* 1968. vol. 103, no.1, p. 35-47

REES, P.M., and JEPSON, P. Measurement of Arterial Geometry and Wall Composition In the Carotid Sinus Baroreceptor Area. *Circulation Research* 1970. vol. 26, p.461-467

RENSEN, S.S.M., *et al.* Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal*, 2007. vol. 15, no. 3, p.100-108

ROGERS, D.C. Possible baroreceptor nerve endings in the vicinity of the amphibian carotid labyrinth. 1964. *da anat.* vol. 57, p.253-266

ROSS, R. The smooth muscle cell growth of Smooth Muscle In culture and format Ion of elastic fibers. *Journal Of Cell Biology* 1971. vol. 50, p.172-186

ROY, J., *et al.* Phenotypic modulation of arterial smooth muscle cells is associated with prolonged activation of ERK1/2. *Differentiation*. 2001. vol. 67, p. 50–58

SANDBLOM, E. and AXELSSON, M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. *J. Exp Biol* 2005. vol. 208, p.821-829.

En: <http://jeb.biologists.org/content/208/5/821.full.pdf>

SEAGARD, J.L., *et al.* Firing characteristics of single-fiber carotid sinus baroreceptors.. *Circ. Res.* 1990. vol. 66, p-1499-1509

SHANAHAN, Catherine M. and WEISSBERG, Peter L. Smooth Muscle Cell Heterogeneity Patterns of Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro and In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.1998. vol.18, p. 333-338

SHIRER, H.W., and TRANK, J.W. Circulatory mechanoreceptors in the pond turtle *Pseudemys scripta Faraci* FM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1982. vol. 242, no. 3, p.216-219



SMITH, D.G., BEROER, P.J., and EVANS, B.K. Baroreceptor control of heart rate in the conscious toad *Bufo marinus*. *Am.J. Phytol.*1981. vol. 341, p.307-311

SMITS, A.W., WEST, N.H., and BURGGREN, W.W. Pulmonary fluid balance following pulmocutaneous baroreceptor denervation in the toad. *J Appl Physiol*. Jul 1986. vol. 61, no. 1, p. 331-7. En: [http://www.biol.unt.edu/~burggren/PDFs/1986/\(54\)Smits,West,Burggren1986JAP.pdf](http://www.biol.unt.edu/~burggren/PDFs/1986/(54)Smits,West,Burggren1986JAP.pdf)

SKOVGAARD, N., et al. Hypoxia-induced vasoconstriction in alligator (*Alligator mississippiensis*) intrapulmonary arteries: a role for endothelin-1? *J Exp Biol*. May 2008. vol. 211 (pt 10), p.1565-70

SUNDIN, L., and NILSSON, G.E. Endothelin redistributes blood flow through the lamellae of rainbow trout gills. *J Comp Physiol* 1998. vol. 168, p.619–623

TAHA, A.A. Effects of denervation on baroreceptor and chemoreceptor endings in the aorta and pulmonary trunk of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *J. Anat.*1987. vol. 150, p.49–60

TAHA, A.A.M., ABDEL-MAGIED, E.M., and KING, A.S. Ultrastructure of aortic and pulmonary baroreceptors in the domestic fowl. *J. Anat.* 1983. vol. 137, no. 1, p.197-207  
En: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1171803/pdf/janat00205-0197.pdf>

TAYLOR, E.W., JORDAN, D., and COOTE, J.H. Central Control of the Cardiovascular and Respiratory Systems and Their Interactions in Vertebrates. *Physiol Rev* . 1999. vol. 79, no. 3, p. 855-916. En <http://physrev.physiology.org/content/79/3/855.full#xref-ref-24-1>

TOCK, J., *et al.* Induction of SM-alpha-actin expression by mechanical strain in adult vascular smooth muscle cells is mediated through activation of JNK and p38 MAP kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. vol. 301, p.1116–1121

VILLASCHI, S., NICOSIA, R.F., and SMITH, M.R. Isolation of a morphologically and functionally distinct smooth muscle cell type from the íntimal aspect of the normal rat

aorta. Evidence for smooth muscle cell heterogeneity. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1994. vol. 30A, no. 9, p.589-95

WALKER-CAPRIOLOGLIO, H.M., KOOB, T.J., and MCGUFFEE, L.J. Proteoglycan synthesis in normotensive and spontaneously hypertensive rat arteries in vitro. Matrix. 1992. vol. 12, p.308–320

WIDDICOMBE, J. Reflexes from the lungs and airways: historical perspective. J Appl Physiol. 2006. vol. 101, p.628 – 634

XIE, P.L., et al. Rapid baroreceptor resetting in chronic hypertension. Implications for normalization of arterial pressure. Hypertension. 1991. Jan. vol. 17, no. 1, p.72-9

ZACCONE, G., *et al.* Immunohistochemical study of the innervation of pulmonary vessels and smooth muscles in the respiratory tract of two frog species. Acta Histochem 2004. vol. 106, p.179 –193, En:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128104000030>