



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas

Mención Ciencias Fisiológicas

ROL DEL EJERCICIO FÍSICO EN LA FUNCIÓN CARDÍACA Y EL CONTROL
AUTONÓMICO EN RATAS CON INSUFICIENCIA CARDÍACA CON FRACCIÓN DE
EYECCIÓN PRESERVADA.

Por:

David Cristóbal Andrade Andrade

Mayo 2018



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas

Mención Ciencias Fisiológicas

ROL DEL EJERCICIO FÍSICO EN LA FUNCIÓN CARDÍACA Y EL CONTROL
AUTONÓMICO EN RATAS CON INSUFICIENCIA CARDÍACA CON FRACCIÓN DE
EYECCIÓN PRESERVADA.

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento de los
requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Ciencias
Fisiológicas.

Por:

David Cristóbal Andrade Andrade

Directores de Tesis:

Dr. Rodrigo Del Rio Troncoso

Dr. Rodrigo Iturriaga Agüera

Mayo 2018

AGRADECIMIENTOS

Proyectos de Investigación:

1. Fondecyt Regular 1140275: Cardiorespiratory imbalance in high-output heart failure: Distinct roles for the central pre-sympathetic neurons and the peripheral carotid chemoreceptors in the progression of the disease (Rodrigo Del Rio, PhD, P.I.).
2. Fondecyt Regular 1150040: Uncovering the role of the carotid body chemoreceptors in the development of the hypertension during chronic intermittent hypoxia: is oxidative stress necessary to activate the chemoreflex pathway? (Rodrigo Iturriaga, PhD, P.I.)

Becas de Estudio

1. Beca Conicyt para estudios de Doctorado en Chile (CONICYT-PCHA #2015-21251230).

ÍNDICE DE MATERIAS

1.- LISTA DE ABREVIATURAS.....	11-16
2.- RESUMEN.....	17-20
3.- ABSTRACT.....	21-23
4.- INTRODUCCIÓN.....	24-40
4.1.- <i>Función cardíaca en HFpEF</i>	28-29
4.2.- <i>Estrés oxidativo en HFpEF</i>	30-32
4.3.- <i>Hiperactividad simpática y desbalance autonómico en HFpEF</i>	32-33
4.4.- <i>Rol del quimiorreflejo ventilatorio y del barorreflejo cardíaco en HFpEF</i>	33-36
4.5.- <i>Rol del ejercicio físico sobre la HFpEF</i>	36-40
5.- HIPÓTESIS.....	41
6.- OBJETIVO GENERAL.....	41
6.1.- <i>Objetivos específicos</i>	41-42
7.- METODOS.....	43-62
8.- RESULTADOS.....	63-178

8.1.- Los animales con HFpEF muestran hipertrofia cardíaca, mayor deposición de colágeno en el ventrículo izquierdo y deterioro de la función cardíaca sistólica y diastólica.....	63-73
8.2.- La zona rostral-ventral-lateral de la médula (RVLM) de los animales con HFpEF está crónicamente activa y presenta un mayor nivel de estrés oxidativo.....	74-76
8.3.- Los animales con HFpEF muestran desbalance autonómico, quimiorreflejo central sobre-activado y barorreflejo cardíaco disminuido.....	77-83
8.4.- La activación aguda del quimiorreflejo central empeora el balance autonómico, la función cardíaca y la arritmogénesis cardíaca en animales con HFpEF.....	84-93
8.5.- La destrucción selectiva de la RVLM restablece el balance autonómico en animales con HFpEF	94-101
8.6.- El deterioro de la función cardíaca y la mayor incidencia de arritmias en los animales con HFpEF disminuyen al eliminar neuronas C1 del RVLM.....	102-111
8.7.- El deterioro de la función cardíaca inducido por la activación del quimiorreflejo central es dependiente de la integridad de las neuronas C1 de la RVLM	112-117
8.8.- El mejoramiento de la función cardíaca y la reducción del tono simpático en animales con HFpEF luego de la eliminación de neuronas C1 no está asociado a la normalización en el control quimiorreflejo central.....	118-121

8.9.- Efecto del ejercicio físico sobre variables fisiológicas basales en animales tolerantes al ejercicio.....	122-125
8.10.- Efecto del ejercicio físico sobre las variables hemodinámicas cardíacas basales en animales con HFpEF tolerantes al ejercicio.....	126-131
8.11.- Efecto del ejercicio físico sobre la función cardíaca en animales tolerantes al ejercicio.....	132-134
8.12.- Efecto del ejercicio físico sobre el control autonómico y el barorreflejo cardíaco en ratas con HFpEF.....	135-142
8.13.- Efecto del ejercicio físico sobre estrés oxidativo y la expresión de enzimas pro y anti- oxidantes a nivel de la RVLM en ratas con HFpEF.....	143-145
8.14.- Efecto del ejercicio físico sobre la incidencia de arritmias cardíacas en ratas con HFpEF.....	146-148
8.15.- Tolerancia/intolerancia al ejercicio físico en animales con HFpEF.....	149-151
8.16.- Parámetros fisiológicos basales en ratas con HFpEF tolerantes e HFpEF intolerantes al ejercicio físico.....	152-154
8.17.- Función cardíaca e intolerancia al ejercicio físico.....	155-158

8.18.- Control simpático e incidencia de arritmias en ratas con HFpEF tolerantes/intolerantes al ejercicio físico.....	159-161
8.19.- Respuesta cardiovascular y simpática a la estimulación hipóxica e hipercápnica moderada en animales con HFpEF intolerantes al ejercicio.....	162-166
8.20.- Rol de los quimiorreceptores periféricos en la tolerancia al ejercicio físico.....	167-169
8.21.- Rol de los quimiorreceptores periféricos en la tolerancia/intolerancia al ejercicio físico en animales con HFpEF.....	171-173
8.22.- La eliminación selectiva de los CB es detrimental para las adaptaciones cardíacas al ejercicio en ratas HFpEF.....	174-178
9.- DISCUSION.....	179-196
9.1.- Las ratas con HFpEF muestran hipertrofia cardíaca y deterioro de la función cardíaca sistólica y diastólica.....	180-181
9.2.- Las ratas con HFpEF presentan desbalance autonómico, mayor estrés oxidativo y activación crónica de la RVLM.....	181-182
9.3.- La activación aguda del quimiorreflejo central empeora el balance autonómico, la función cardíaca y la arritmogénesis cardíaca en animales con HFpEF.....	182-184

9.4.- La eliminación selectiva del RVLM restablece el balance autonómico en animales con HFpEF.....	184-186
9.5.- El deterioro de la función cardíaca y la mayor incidencia de arritmias en los animales con HFpEF disminuyen al eliminar neuronas catecolaminérgicas de la RVLM.....	186-187
9.6. Rol del ejercicio físico sobre la función cardíaca y el control autonómico en ratas con HFpEF.....	187-189
9.7. Efecto del ejercicio físico sobre estrés oxidativo y la expresión de enzimas pro y anti- oxidantes a nivel de la RVLM en ratas con HFpEF.....	190-191
9.8. Rol del ejercicio físico sobre la incidencia de arritmias cardíacas en ratas con HFpEF.....	191
9.9. Tolerancia/intolerancia al ejercicio físico y su rol en la función cardíaca en animales con HFpEF.....	192-193
9.10. Rol de la intolerancia al ejercicio físico sobre la incidencia de eventos arrítmicos en ratas con HFpEF.....	193
9.11. Rol de los quimiorreceptores periféricos sobre la incidencia de mortalidad en ratas HFpEF intolerantes al ejercicio físico.....	193-196

10.- CONCLUSIONES.....	197-198
------------------------	---------

11.- BIBLIOGRAFÍA.....	199-225
------------------------	---------

1.- LISTA DE ABREVIATURAS

AngII: Angiotensin II [Angiotensina II]

AT1R: Angiotensin II receptor type 1 [Receptor de angiotensina II tipo 1]

BP: Blood pressure [Presión arterial]

BRS: Baroreflex sensitivity [Sensibilidad del Barorreflejo]

BW: Body weight [peso corporal]

CB: Carotid body [Cuerpo carotídeo]

CBA: Carotid body ablation [Ablación del cuerpo carotideo]

CHF: Chronic heart failure [Insuficiencia cardíaca crónica]

CO: Cardiac output [Gasto cardíaco]

Cu-Zn-SOD: Copper zinc superoxide dismutase [Cobre zinc superóxido dismutasa]

CVLM: Caudal ventrolateral medulla [zona caudal ventro-lateral del tronco encéfalo]

DBP: Diastolic blood pressure [Presión arterial diastólica]

DHE: Dihydroethidium [Dihidroetidio]

DMV (DMNV): Dorsal motor nucleus of vagus nerve [Núcleo motor dorsal del nervio vago]

D β H: Anticuerpo anti-dopamina- β -hydroxylasa

Ea: Arterial Elastance [elastancia arterial]

ECG: Electrocardiograma

EDPVR: End diastolic pressure-volume relationship [Relación presión-volumen de fin de diástole]

EF: Ejection fraction [Fracción de eyección]

ESPVR: End systolic pressure-volume relationship [Relación presión-volumen de fin de sistole]

ExT: Exercise training [Entrenamiento físico]

FFT: Fast fourier transform [Transformación rápida de Fourier]

FiCO₂: Fractional inspired carbon dioxide [Fracción inspirada de dióxido de carbono]

FiO₂: Fraction of inspired oxygen [Fracción inspirada de oxígeno]

FS: Fractional shortening [Fracción de acortamiento]

HCVR: Hypercapnic ventilatory response [Respuesta ventilatoria a la hipercapnia]

HF: Heart failure [Insuficiencia cardíaca]

HF_{HRV}: High frequency [Alta frecuencia]

HFpEF: Heart failure with preserved ejection fraction [Insuficiencia cardíaca con fracción eyectada preservada]

HF_rEF: Heart failure with reduced ejection fraction [Insuficiencia cardíaca con fracción eyectada reducida]

HR: Heart rate [Frecuencia cardíaca]

HRV: Hear rate variability [Variabilidad del ritmo cardíaco]

HVR: Hypoxic ventilatory response [Respuesta ventilatoria a la hipoxia]

HW: Heart weight

inT: Intolerant [intolerante]

LF_{HRV}: Low frequency [Baja frecuencia]

LF/HF_{HRV}: Low/high frequency of heart rate variability [Razón de baja frecuencia/alta frecuencia de la variabilidad del ritmo cardíaco]

Lung W/D: Lung wet/dry [Pulmón húmedo/seco]

LV: Left ventricle [Ventrículo izquierdo]

LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter [Diámetro de fin de diástole del ventrículo izquierdo]

LVEDP: Left ventricular end-diastolic pressure [Presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo]

LVEDV: Left ventricular end-diastolic volume [Volumen de fin de diástole del ventrículo izquierdo]

LVEF: Left ventricular ejection fraction [Fracción eyectada del ventrículo izquierdo]

LVEDD: left ventricular end-systolic diameter [Diámetro de fin de sístole del ventrículo izquierdo]

LVESP: Left ventricular end-systolic pressure [Presión de fin de sístole del ventrículo izquierdo]

LVESV: Left ventricular end-systolic volume [Volumen de fin de sístole del ventrículo izquierdo]

LVV: Lentiviral vector [Vector lentiviral]

MABP: Mean Arterial Pressure [Presión arterial media]

MDA: Malondialdehyde [Malondialdehído]

MMP2: Metalloproteinase-2 [Metaloproteínasa-2]

Mn-SOD: Manganese superoxide dismutase [Manganeso superóxido dismutasa]

NA: Nucleus ambiguous [Núcleo ambiguo]

NOX: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate [Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato]

NTS: Nucleus of tractus solitarius [Núcleo del tracto solitario]

PFA: Paraformaldehyde [Paraformaldehído]

PP: Pulse pressure [Presión de pulso]

R_r: Respiratory frequency [Frecuencia respiratoria]

ROS: Reactive oxygen species [Especies reactivas de oxígeno]

RTN: Retrotrapezoid nucleus [Núcleo retrotrapezoide]

RVLM: Rostral ventrolateral medulla [Zona rostral ventrolateral del bulbo raquídeo]

SAP: Saporin [Saporina]

SBP: Systolic blood pressure [Presión arterial sistólica]

SV: Stroke volume [Volumen eyectado]

SW: Stroke work [Trabajo cardíaco]

TH: Tyrosine hydroxylase [Tirosina hidroxilasa]

TIMP2: Tissue inhibitor of Metalloproteinase-2 [Inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2]

T: Tolerant [tolerante]

V_E: Minute ventilation [Ventilación minuto]

V_{eh}: Vehicle [Vehículo]

VO_{2peak}: Peak oxygen consumption [Consumo “peak” de oxígeno]

V_T: Tidal Volume [Volumen corriente]

***Todas las abreviaturas de esta tesis doctoral están en inglés, ya que corresponden a manuscritos publicados, aceptados, en prensa y/o enviados a diferentes revistas de la especialidad.**

2.- RESUMEN

La insuficiencia cardíaca (HF) puede ser clasificada de acuerdo a la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (EF) en: i) HF con EF reducida (HFrEF) y ii) HF con EF preservada (HFpEF). Independiente de la etiología de la HF, los pacientes con HF muestran un deterioro del control autonómico. En HFrEF, el ejercicio físico (ExT) ha mostrado ser una terapia efectiva para restaurar el balance autonómico, principalmente por la reducción del estrés oxidativo en los centros de regulación cardiovascular ubicados en el tronco encefálico. Por el contrario, existe controversia sobre los efectos de ExT en el balance autonómico en HFpEF. Por lo tanto, propongo como hipótesis que *“El ejercicio físico disminuye el estrés oxidativo en las neuronas presimpáticas de la zona rostral ventrolateral (RVLM) del tronco encéfalo, restaurando el control autonómico y la función cardíaca en animales con HFpEF”*.

Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis fue determinar en un modelo preclínico de HFpEF, los efectos del ExT crónico sobre: i) los niveles de estrés oxidativo y actividad de las neuronas pre-simpáticas ubicadas en el RVLM, ii) el desbalance autonómico, iii) el quimiorreflejo ventilatorio, iv) barorreflejo cardíaco (BRS), v) remodelamiento cardíaco, y vi) y función cardíaca. La HFpEF fue inducida en ratas Sprague Dawley machos adultos ~250 g, por una fístula arteriovenosa. Los animales se dividieron en los siguientes grupos: HFpEF; HFpEF+Sedentario (HFpEF+Sed); HFpEF+ExT; Sham; Sham+Sed; Sham+ExT. El entrenamiento duró 6 semanas. El nivel de activación y el estrés oxidativo de las neuronas

pre-simpáticas del RVLM se determinó por la expresión de Fos-b mediante inmunoblot y ensayo de dihidroetidum (DHE), respectivamente. El balance autonómico se determinó mediante el análisis de la variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV) en el dominio de la frecuencia y no lineal, y por los cambios en la frecuencia cardíaca (HR) después de la administración de atropina y propranolol (iv. o ip.). BRS se determinó por el método de secuencia. El quimiorreflejo ventilatorio periférico y central fue determinado por pletismografía corporal completa utilizando estimulación hipóxica (F_{iO_2} 10% y 12%) o estimulación hipercápnica (F_{iCO_2} 7%), respectivamente. El remodelamiento cardíaco se midió con la tinción Picro Sirius rojo y cuantificación de los cambios en el contenido de colágeno en el ventrículo izquierdo. Como indicador de síntesis y degradación de matriz extracelular se midió la expresión de metaloproteasa-2 (MMP-2) y del inhibidor tisular de MMP-2 (TIMP-2). La función cardíaca se midió con “loops” presión-volumen intraventriculares durante la oclusión de la vena cava. Las ratas HFpEF desarrollaron hipertrofia cardíaca, depósitos de colágeno en el ventrículo izquierdo, desbalance autonómico cardíaco, aumento de la ganancia del quimiorreflejo central exacerbada, sin cambios significativos en la ganancia quimiorrefleja periférica hipóxica y reducción de BRS. Además, las ratas HFpEF mostraron aumentos en el estrés oxidativo y activación crónica de las neuronas del RVLM. También, la estimulación hipercápnica aguda en HFpEF incrementó el “drive” simpático al corazón, aumentó las arritmias cardíacas lo que produjo una

disminución adicional en la función cardíaca diastólica. En ratas HFpEF, ExT produjo una disminución significativa de la progresión del deterioro de la función cardíaca, restauró el control autonómico cardíaco, y redujo la incidencia de arritmias. Además, las ratas HFpEF+ExT mostraron una disminución de la fosforilación de la subunidad p-47phox de NOX en la RVLM junto con una disminución de estrés oxidativo en la RVLM. De manera importante, identificamos un subgrupo de ratas HFpEF entrenadas que mostraron intolerancia al ejercicio (HFpEF+Ex-int) (44%). Notablemente, las ratas HFpEF+EX-inT no desarrollaron adaptaciones positivas a ExT (control autonómico, incidencia de arritmias y función cardíaca). Aún más, un estímulo hipóxico moderado (FiO₂ 10%) desencadenó un arresto cardíaco súbito (40%). Este resultado sugiere que la baja sensibilidad a la hipoxia en HFpEF puede ser responsable de la muerte súbita cardíaca durante la estimulación hipóxica, pero también que el cuerpo carotideo (CB), que es el principal quimiorreceptor de oxígeno puede estar involucrado en la tolerancia al ejercicio. De manera interesante, encontramos que la denervación del CB disminuyó significativamente la tolerancia al ejercicio en las ratas Sham y HFpEF+ExT. En resumen, ExT mejoró el control autonómico y la función cardíaca solo en las ratas HFpEF tolerantes al ejercicio. Además, la tolerancia al ejercicio físico fue relacionada con la respuesta quimiorrefleja periférica a la hipoxia.

3.- ABSTRACT

Heart failure (HF) can be classified according to left ventricle ejection fraction (EF) into i) HF with reduce EF (HFrEF) and ii) with preserved EF (HFpEF). Independent of the HF etiology, HF patients displayed autonomic control impairment. In HFrEF, exercise training (ExT) has been showed to be an effective therapy to restore normal autonomic balance, mainly by the restoration of oxidative stress levels in cardiovascular regulation centers located in the brainstem. On the contrary to what is known in HFrEF, there is controversial evidence about the effects of ExT on autonomic balance in HFpEF. Therefore, I propose as hypothesis that *"Exercise training decreases oxidative stress in pre-sympathetic neurons of the rostral ventrolateral medulla (RVLM), restoring autonomic control and cardiac function in animals with HFpEF."* Thus, the main objective of this thesis was to determine in an experimental model of HFpEF, the effects of chronic ExT on: i) oxidative stress levels and pre-sympathetic neurons activity located in the RVLM, ii) autonomic imbalance, iii) ventilatory chemoreflex, iv) cardiac baroreflex (BRS), v) cardiac remodeling, and vi) cardiac function. HFpEF was induced in adult male Sprague Dawley adult rats ~250 g, by an arterio-venous fistula. The animals were divided in groups as follow: HFpEF; HFpEF + Sedentary (HFpEF + Sed); HFpEF + ExT; Sham; Sham + Sed; Sham + ExT. The training protocol lasted 6 weeks. The level of activation and oxidative stress of pre-sympathetic RVLM neurons was determined by Fos-b protein expression by immunoblot and by dihydroetidium

(DHE) assay, respectively. Autonomic balance was determined by heart rate variability (HRV) analysis both in the frequency and nonlinear domain, and by changes in heart rate (HR) after administration (i.v. or i.p.) of atropine and propranolol. Baroreflex sensitivity was determined by the sequence method. Peripheral and central ventilatory chemoreflex was determined by whole body plethysmography using hypoxic (FiO_2 10 % and 12%) or hypercapnic stimulation (FiCO_2 7%), respectively. Cardiac remodeling was determined by Picro Sirius red staining and quantifying the changes in left ventricle (LV) collagen content. Changes in the expression of metalloprotease-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of MMP 2 (TIMP-2) were determined in cardiac tissue as an indicator of synthesis and degradation of extracellular matrix. Cardiac function was measured by pressure-volume intraventricular "loops" during the occlusion of the vena cava. HFpEF rats (compared to Sham rats) showed cardiac hypertrophy, LV collagen deposition, cardiac autonomic imbalance, exacerbated central chemoreflex gain, without significant changes in peripheral chemoreflex gain and reduction of BRS. Additionally, HFpEF rats displayed increases in oxidative stress and chronic activation of RVLM neurons. Also, acute hypercapnic stimulation in HFpEF rats further increase sympathetic drive to the heart triggering cardiac arrhythmias being the outcome a further decrease in diastolic cardiac function. In HFpEF rats, ExT results in a significant decrease in the progression of cardiac function deterioration, restores cardiac autonomic control, cardiac function and reduce arrhythmia incidence. Also, HFpEF+ExT rats

displayed a decrease phosphorylation of the p-47phox subunit of NOX in the RVLM along with a significantly less oxidative stress in the RVLM. Importantly, we identified a subgroup of trained HFpEF rats which showed exercise intolerance (HFpEF+EX-inT) (44%). Notably, HFpEF+EX-inT rats did not show positive adaptations to ExT (autonomic control, incidence of arrhythmias and cardiac function). Even more, a mild hypoxic stimulus (FiO₂ 10%) triggers a sudden cardiac arrest (40 %). This result suggests that a low sensitivity to hypoxia in HFpEF may be responsible for sudden cardiac death during hypoxic stimulation but also suggest that peripheral carotid body (CB) chemoreceptors, that is the main oxygen sensors, maybe involved in exercise tolerance. Interestingly, we found that CB denervation in Sham and HFpEF+ExT rats, significantly decreased exercise tolerance. In summary, ExT improved autonomic control and cardiac function in HFpEF rats only in exercise tolerant rats. Moreover, the tolerance to exercise training was related to peripheral chemoreflex responses to hypoxia.

4.- INTRODUCCIÓN

La insuficiencia cardíaca (HF) es una patología de alta prevalencia a nivel mundial, con altos índices de mortalidad y hospitalizaciones frecuentes, las cuales conllevan a una pobre calidad de vida (Rodrigue-Aratalejo y cols. 1997; Abassi y cols. 2011; Lindenfield y cols. 2010). Se estima que el 20% de todas las hospitalizaciones de personas sobre los 65 años se deben a esta enfermedad (Abassi y cols. 2011). De manera similar, en Chile hay una alta prevalencia de HF (3% de la población total y >20% de personas sobre los 60 años), siendo la población sobre los 60 años la que presenta mayor hospitalización por HF (Castro y cols. 2004).

Según la Sociedad Americana de Insuficiencia Cardíaca, la HF es una patología caracterizada generalmente por la disfunción y/o pérdida de tejido contráctil cardíaco, además se caracteriza por dilatación del ventrículo, hipertrofia o ambos, lo cual conlleva a un deterioro severo de la función cardíaca (Lindenfield y cols. 2010). Se han descrito dos tipos de HF dependiendo de los cambios en la fracción eyectada del ventrículo izquierdo (LVEF). La EF es el porcentaje de sangre que se eyecta desde el ventrículo izquierdo, con respecto al volumen con que se llena la cámara del ventrículo. La primera se caracteriza por una disminución en la fracción de eyección (EF) (<40%) (HFrEF) y la segunda es representada por una EF preservada o aumentada (>50%) (HFpEF). La prevalencia de estos dos tipos de HF es similar (Chile: HFrEF: 55% y HFpEF: 45%) (Castro y cols. 2004), sin embargo, en la

HFpEF no existen tratamientos que logren mejorar la supervivencia de los pacientes que la padecen (Abassi y cols. 2011).

Un marcador fisiopatológico característico de pacientes con HF es el incremento en el nivel de catecolaminas circulantes (Parker 1992), producto de hiperactivación simpática (Schultz y Sun 2000). Se ha propuesto que la excesiva activación del sistema nervioso simpático podría contribuir a deteriorar más la función cardíaca, incrementar la incidencia de eventos arrítmicos, lo que contribuye a incrementar el riesgo de mortalidad en estos pacientes (Cohn y cols. 1984). Esta evidencia sugiere fuertemente que, en HF, ciertos grupos neuronales asociados al control simpático cardíaco podrían aumentar su actividad. En efecto en modelos animales de HFrEF, se encontró una activación crónica de grupos neuronales asociados al control simpático cardíaco, ubicados en la zona rostro ventrolateral del bulbo raquídeo (RVLM). La activación de estas neuronas está asociada a un incremento en el nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS), mediado mayoritariamente por la expresión de la enzima prooxidante, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NOX) (Gao y cols. 2004; Mousa y cols. 2008; Byne y cols. 2003). De manera interesante, se ha demostrado que la hiperactivación crónica de la RVLM en HFrEF es dependiente de la actividad de los cuerpos carotídeos (CB). En efecto, la ablación selectiva de los CB disminuye el quimiorreflejo ventilatorio hipóxico, restablece el barorreflejo (BRS) cardíaco y disminuye la activación crónica de la RVLM (Del Rio y cols. 2013). De manera importante, tanto la sobre-activación

del quimiorreflejo como también la disminución del BRS, están estrechamente relacionados a la sobrevivencia de los pacientes con HFrEF (Giannoni y cols. 2009). Por el contrario, se sabe mucho menos de las alteraciones autonómicas, cardiovasculares y los mecanismos relacionados a la progresión de la HFpEF. Sin embargo, Kitzman y cols. (2002) describieron que tanto pacientes con HFpEF como HFrEF presentan concentraciones plasmáticas de norepinefrina similares entre estos dos tipos de HF, sugiriendo que existe una activación simpática equivalente en ambas condiciones, la cual sería independiente de la etiología de la HF.

El ejercicio físico se usa para disminuir las alteraciones autonómicas en diferentes condiciones fisiopatológicas (Antonicelli y cols. 2016; Besnier y cols. 2017; Gao y cols. 2007; Hsu y cols. 2015; La Rovere y cols. 2002; Murad y cols. 2012; Yeh y cols. 2011). De hecho, en la HFrEF el ejercicio físico ha mostrado tener efectos beneficiosos en la recuperación del desbalance autonómico (Antonicelli y cols. 2016; Besnier y cols. 2017; Gao y cols. 2007). Los mecanismos asociados al entrenamiento y adaptaciones a nivel reflejo y neural (quimiorreflejo, barorreflejo, estrés oxidativo en el tronco encéfalo, etc.) en HFrEF han sido ampliamente estudiados (Gao y cols. 2004; 2007; Mousa y cols. 2008; Jackson y cols. 2005; Kleiber y cols. 2008; Li y cols. 2008; Negrao y cols. 2008; Coast y cols. 1992). Sin embargo, los mecanismos reflejos y neuronales, asociados a los efectos del ejercicio físico en HFpEF no han sido descritos en su totalidad.

En modelos experimentales de HFrEF, el ejercicio físico disminuye la descarga del nervio simpático renal, mejora el BRS cardíaco, aumenta la expresión de Cu/Zn-SOD y Mn-SOD, y disminuye la actividad de la NOX en la RVLM (Gao y cols. 2007). Además, se ha descrito que un programa de entrenamiento físico en conejos con HFrEF, disminuye la descarga quimiosensorial carotidea basal y en respuesta a la hipoxia (Sun y cols. 1999), sugiriendo que los efectos beneficiosos del ejercicio físico sobre las alteraciones cardiovasculares en HFrEF, estarían asociados a la normalización de la función quimiorrefleja carotidea y la disminución del nivel de estrés oxidativo en el RVLM. Por el contrario, la evidencia experimental respecto a que si el ejercicio físico tiene efectos terapéuticos en HFpEF es controversial (Bowen y cols. 2015; Edilma y cols. 2011). Entrenamientos de caminata de 12-16 semanas de duración han mostrado ser eficaces en aumentar la performance aeróbica (VO_2 peak) sin cambios significativos en la morfología cardíaca (Bosen y cols. 2015; Gary 2006; Ritman y cols. 2010). Además, se ha demostrado que en pacientes con HFpEF, el incremento de la capacidad aeróbica no mejora significativamente la función cardíaca (Bosen y cols. 2015). Sin embargo, Federmann y cols. (2011), reportaron que el entrenamiento aeróbico mejora parcialmente la elastancia del corazón y disminuye la hipertrofia ventricular izquierda en pacientes con HFpEF. Además, Añadí y cols. (2014) mostraron que un programa de ejercicio físico de alta intensidad (90% de la frecuencia cardíaca máxima) mejora la función cardíaca en pacientes con HFpEF. Estos resultados muestran que los efectos

terapéuticos del ejercicio físico en HFpEF son dependientes del patrón e intensidad del entrenamiento. Más aún, la evidencia de que distintos patrones de ejercicio tienen efectos moderados en la performance aeróbica (7 a 10%) y disimiles en la función cardíaca, hace pensar que existen mecanismos distintos que se ven activados por el tipo de patrón de ejercicio. Sin embargo, en HFpEF no se sabe cuáles son los mecanismos relacionados a los efectos beneficiosos del ejercicio físico. Tomando en consideración que ambos tipos de HF presentan un desbalance autonómico similar, es posible hipotetizar que la restauración del balance autonómico en HFpEF sería un mecanismo importante por el cual el ejercicio físico la función cardíaca y consecuentemente podría mejorar la calidad de vida de estos pacientes. De manera interesante, y a pesar de que el ejercicio físico podría ser una estrategia no farmacológica factible para mejorar la progresión de la HFpEF, se ha mostrado que un grupo de pacientes con HF no adhieren al tratamiento (Tabet y cols. 2008), lo que podría responder a la heterogeneidad de la población de pacientes con HF, relacionado quizás a las diferencias en el nivel de control autonómico, lo que podría contribuir a la tolerancia al ejercicio físico. Esta condición particular no se ha descrito si ocurre o no en HFpEF y tampoco se sabe si es que podría estar asociado a esta excesiva activación simpática presente en esta población.

4.1.- Función cardíaca en modelos experimentales HFpEF

El músculo cardíaco presenta propiedades tanto activas (función sistólica) como pasivas (función diastólica) (Borlaug 2014). En HFrEF existe un deterioro de la capacidad contráctil

del músculo cardíaco (Jessup 2007). Sin embargo, en HFpEF, la mayor alteración es el deterioro progresivo en la fase de llenado ventricular, donde por un aumento de la pre y/o post carga cardíaca existe un aumento en la presión de fin de diástole (LVEDP) (Kass y cols. 2004). Para el diagnóstico de la HFpEF son necesarias tres condiciones: i) signos y síntomas de insuficiencia cardíaca, ii) una EF >50%, y iii) presencia de disfunción diastólica, reflejada en un incremento en la relación presión-volumen de fin de diástole (EDPVR) del ventrículo izquierdo (Paulus y cols. 2007).

Se han utilizado modelos preclínicos de HF para estudiar los mecanismos asociados a las alteraciones en la función cardíaca. Así, en modelos experimentales de HFpEF por sobrecarga de volumen, por medio de la creación de una fistula arteriovenosa (Monnet y Chachques 2005; Abassi 2011), se ha demostrado que existe un incremento del volumen eyectado (SV), mayor gasto cardíaco (CO), mayor LVEDP y un incremento del EDPVR (Yoshimura y cols. 2000; Shigematsu y cols. 2001). Además, se ha observado que estos animales presentan congestión pulmonar e hipertrofia cardíaca (Yoshimura y cols. 2000; Shigematsu y cols. 2001; Carcia y Diebold 1990; Flaim y cols. 1979). Una explicación en la mantención de la EF en HFpEF, por sobrecarga de volumen, es que no existen mayores alteraciones en el volumen de fin de sístole (LVESV). En efecto, el incremento del SV está determinado mayoritariamente por un incremento severo del LVEDV, sin pérdida de los componentes contráctiles (Abassi 2011). Por el contrario, en HFrEF, causada

experimentalmente por un infarto, existe perdida del componente contráctil, se observa un deterioro progresivo de la contractibilidad cardíaca y consecuentemente una disminución significativa de la EF (Del Rio y cols. 2013).

4.2.- Estrés oxidativo en HFpEF

Independiente de la etiología de la HF (reducida o preservada) se han descrito incrementos en el nivel de estrés oxidativo sistémico y en el músculo cardíaco (Gao y cols. 2004; Keith y cols. 1998; Diaz-Velez y cols. 1996), lo que se ha relacionado con alteraciones en la estructura del corazón, como el grado de remodelamiento cardiaco (Tsutsui y cols. 2011) y, por lo tanto, con el deterioro continuo de la función cardíaca (Zucker 2006). Adicionalmente, en HFrEF se ha reportado que en el tronco encéfalo existe una producción elevada de ROS en la RVLM (Gao y cols. 2004). Este es uno de los núcleos más relevantes en el control simpático cardiovascular en HF, ya que es el último relevo antes de la salida simpática hacia diferentes territorios (Guyenet 2010). Se ha propuesto que el aumento en el estrés oxidativo a nivel del tronco encéfalo contribuiría a desarrollar alteraciones autonómicas y cardiorrespiratorias y consecuentemente a la progresión de la HF (Zucker 2006; Prasad y cols. 1996). Se han descrito que las mayores fuentes de producción de ROS en modelos experimentales de HF son la xantina oxidasa (Hare y Johnson 2003) y la NOX2 (Heymes y cols. 2003). La NOX2 es un complejo enzimático de cinco subunidades que transfiere electrones desde la NADPH al oxígeno molecular para producir radical superóxido

(Tammariello y cols. 2000). Las subunidades que la conforman son la: p47, p67, p22, p40 y gp91^{phox} (Bedard y cols. 2007). Las subunidades p22 y gp91^{phox} son proteínas transmembrana, mientras que las subunidades p40, p47 y p67^{phox} son polipéptidos citosólicos, los cuales son translocados a la membrana por endosomas tempranos, para formar el complejo y además son requeridos para la producción de superóxido (Bedard y cols. 2007; DeLeo y Quinn 1996). En ratas con HFrEF se ha descrito que existe un incremento en la expresión de las subunidades p40, p47 y gp91^{phox}, y mayor producción de ROS en neuronas pre-simpáticas alojadas en la RVLM (Gao y cols. 2004). Se ha sugerido que el aumento en la producción de ROS en la RVLM incrementa la actividad de neuronas pre-simpáticas (Griffioen y cols. 2007), lo que desencadenaría un aumento de la salida simpática hacia diversos territorios (Francis 1985). Junto al aumento de la expresión de enzimas con actividad prooxidante en animales con HFrEF se ha descrito una disminución de la expresión de enzimas antioxidantes, como la Cu/Zn-SOD (Lindey y cols. 2004) y la Mn-SOD en la RVLM (Gao y cols. 2007). Estas isoformas de la SOD catalizan la reacción de degradación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno (McCord y cols. 1969).

Contrario a lo extensamente descrito en modelos experimentales de HFrEF, en la HFpEF los eventos relacionados a la producción de ROS tanto a nivel central como periférico no se han estudiado en detalle. En ratas con HFpEF, inducida por una sobrecarga de volumen, se encontró un mayor nivel de malondialdehído (MDA), un indicador de daño peroxilipídico,

en tejido cardíaco (Wojciechowski y cols. 2010). Adicionalmente, pacientes con HF que poseen una EF >40% tienen mayores niveles de MDA en el plasma (Diaz-Velez y cols. 1996) y mayor estrés oxidativo en el pericardio (Mallat y cols. 1998). No obstante, a pesar de que los pacientes con HFpEF presentan una mayor actividad simpática y estrés oxidativo, no se han descrito en modelos experimentales preclínicos si existen alteraciones en el estado de oxido-reducción en grupos de neuronas asociadas al control cardiovascular. Sin embargo, Yoshimura y cols. (2000) mostraron un aumento en la vía de señalización del sistema renina angiotensina, caracterizado por un mayor nivel de expresión del receptor de angiotensina tipo 1 (AT1_R) en el núcleo del tracto solitario (NTS) de animales con HFpEF. Lo anterior es muy importante debido a que se ha descrito que la activación de los receptores AT1_R por angiotensina II (AngII), desencadena la activación de la NOX, aumentando la producción de ROS (Gao y cols. 2008). Sin embargo, no se ha descrito si existe mayores niveles de AngII en el tronco encéfalo de animales con HFpEF. No obstante, estos antecedentes permiten sugerir que en HFpEF exista estrés oxidativo en el RVLM, lo que gatillaría la activación de neuronas pre-simpáticas y desbalance autonómico descrito en estos pacientes (Kitzman y cols. 2002).

4.3.- Hiperactividad simpática y desbalance autonómico en HFpEF.

En HF se ha descrito que existe un desbalance autonómico, caracterizado por un aumento de la actividad simpática y una disminución del control parasimpático (Johnson y cols. 2013).

El desbalance autonómico en HF sería un ajuste compensatorio de la reducción de la función cardíaca y puede ser beneficioso inicialmente para mantener una adecuada perfusión de los tejidos periféricos en fases tempranas de HF (Zucker 2006). Sin embargo, este mecanismo compensatorio se hace más intenso y sostenido en el tiempo, contribuyendo finalmente a la progresión de la enfermedad (Del Rio y cols. 2013). En HFrEF se encontró que el aumento en la actividad neuronal de la RVLM y consecuentemente el incremento del tono simpático depende del aumento en la respuesta ventilatoria quimiorrefleja carotidea a la hipoxia (Del Rio y cols. 2013). Más aún, la ablación selectiva de los CBs en la rata con HFrEF, disminuye la activación crónica de la RVLM, disminuyendo la sobreactivación simpática, la incidencia de eventos arrítmicos y finalmente aumenta la sobrevivencia de las ratas (Del Rio y cols. 2013).

Por otro lado, en HFpEF existe poca evidencia experimental con respecto a los ajustes centrales del control autonómico (Andrade y cols. 2015). Sin embargo, se ha descrito en el modelo de HFpEF inducido por fistula arteriovenosa, que hay un incremento en la descarga simpática renal (Kristen y cols. 2002). No obstante, los mecanismos a nivel del sistema nervioso central relacionados al aumento en el tono simpático en HFpEF y su contribución a la generación del desbalance autonómico y la progresión de la patología no han sido estudiados en su totalidad (Andrade y cols. 2015).

4.4.- Rol del quimiorreflejo ventilatorio y del barorreflejo cardíaco en HFpEF

Los principales quimiorreceptores arteriales periféricos son los CBs, que detectan cambios en la pO_2 , pCO_2 , pH, glicemia y flujo en la sangre arterial (Iturriaga y Alcayaga 2004; Atanasova y cols., 2011; Gonzalez y col., 1994). Ante un estímulo hipóxico, los CBs desencadenan aumentos reflejos de la ventilación, de la descarga simpática, del gasto cardíaco y de la presión arterial (BP) (Prabhakar y Peng 2004). Su ubicación estratégica en la bifurcación carotidea les permite detectar estas modificaciones antes de que la sangre alcance al cerebro. Los CBs están formados por células quimiorreceptoras (células tipo I o glómicas), las cuales están rodeadas de células tipo glial (células tipo II) (Iturriaga y Alcayaga 2004; Iturriaga y cols. 2007). El modelo más aceptado de la quimiotransducción carotidea propone que los estímulos despolarizan las células glómicas, lo cual desencadena un incremento intracelular de $[Ca^{2+}]$ y la subsecuente liberación de uno o más neurotransmisores excitatorios (Iturriaga y Alcayaga 2004). Las fibras quimiosensoriales que inervan a las células quimiorreceptoras en el CB proyectan al NTS, el cual integra información que llega desde los CB, los barorreceptores arteriales y aferencias cardiopulmonares vagales (Benarroch 1994).

Existen quimiorreceptores centrales ubicados principalmente en la superficie ventral del tronco encéfalo. El núcleo retrotrapezoide (RTN) es el principal núcleo quimiorreceptor central (Nattie y Li 2012; Gueyenet y cols. 2012; Stornetta y cols. 2006). Sus neuronas quimiorreceptoras son sensibles a cambios de pH, probablemente secundarios a cambios en

la $p\text{CO}_2$ y participan en la regulación de la actividad del centro generador del ritmo respiratorio (Guyenet y cols. 2013; 2016; Mulkey y cols. 2010). Se ha propuesto que las neuronas del RTN actúan como un centro integrador de la información quimiosensorial que viene desde otros territorios, incluyendo a los CB (Guyenet 2014). En efecto, se ha observado que la activación de los CB puede estimular al centro generador del ritmo respiratorio directamente a través del NTS, pero también puede hacerlo a través del RTN, sugiriendo fuertemente que hay una interdependencia de la quimiotransducción central y periférica (Guyenet y cols. 2017).

Los barorreceptores participan en el control de la BP a corto plazo. Las fluctuaciones de la BP son detectadas por estos receptores (Michellini y Stern 2009) y reguladas por el sistema nervioso central (Hagglund y cols. 2012; da Silva y cols. 2009). Los barorreceptores están ubicados en el arco aórtico y en la bifurcación de la arteria carótida común (Robertson y cols. 2012). Las terminaciones de las neuronas baro sensoriales son sensibles a los cambios mecánicos producidos por la onda de presión (Michellini y Stern 2009; Korner 1971; Kirchheim; 1976). Los barorreceptores producen potenciales de acción que se propagan, a través del nervio vago y del nervio glossofaríngeo hacia el NTS (Kirchheim; 1976; Korner 1971; van Giersbergen y cols. 1992). En este núcleo, hay neuronas de segundo y tercer orden que hacen sinapsis con el núcleo ambiguo (NA) y el núcleo motor dorsal del vago (DMNV) (Korner 1971), que son parte del sistema parasimpático. Frente a un aumento de presión

arterial, los barorreceptores incrementan la tasa de disparo de potenciales de acción produciendo un aumento de la actividad vagal y disminución de la actividad simpática cronotrópica y ionotrópica en el corazón (Michellini y Stern 2009). Las neuronas en el NTS también establecen sinapsis con las neuronas de la zona ventrolateral caudal del tronco encéfalo (CVLM) (Donald y Shepherd 1980), las cuales hacen sinapsis inhibitorias gabaérgicas con el RVLM (Agarwal y Calaresu 1991; Guertzenstein y Silver 1974; Blessing 1990; Dampney y Goorchild 1985). Por lo tanto, una activación de los BR aumenta el control vagal e inhibe el control simpático.

El incremento del quimiorreflejo carotideo, medido por la repuesta ventilatoria a la hipoxia (Del Rio y cols. 2013; Marcus y cols. 2014; Giannoni y cols. 2009) y la disminución del barorreflejo cardíaco, medido por la respuesta cardiovascular a un aumento/disminución de la presión arterial (Schwartz y cols. 2015), son considerados marcadores de severidad en HFrEF. Se ha descrito que pacientes y animales con HFrEF presentan un aumento en la ganancia del quimiorreflejo carotideo, el cual está estrechamente correlacionado al aumento del tono simpático y a la disminución de la eficiencia del BRS cardíaco (Del Rio y cols. 2013). Se ha demostrado en ratas infartadas (HFrEF), que la denervación selectiva de los CBs disminuye el quimiorreflejo periférico y aumenta el BRS cardíaco (Del Rio y cols. 2013). Por lo tanto, en HFrEF se sugiere que la disminución del BRS es dependiente del aumento de actividad de los quimiorreceptores periféricos (Del Rio y cols. 2013).

Por el contrario, a lo que se sabe en HFrEF, en pacientes o modelos experimentales de HFpEF no se ha descrito cual es la contribución de los quimiorreflejos en la progresión de la patología. Sin embargo, se ha descrito que perros con fistula arteriovenosa presentan una disminución significativa del barorreflejo cardíaco (Chen y cols. 1991). Tomando en consideración la relevancia que tienen los quimiorreflejos en la progresión de la HFrEF, es relevante determinar la posible contribución de los quimiorreceptores (periféricos y centrales) en la progresión de la HFpEF, ya que estos podrían estar involucrados en la severidad de la patología.

4.5.- Rol del ejercicio físico sobre la HFpEF

El ejercicio físico es la terapia no farmacológica más utilizada para mitigar las alteraciones autonómicas en diferentes condiciones fisiopatológicas (Antonicelli y cols. 2016; Besnier y cols. 2017; Gao y cols. 2007; Hsu y cols. 2015; La Rovere y cols. 2002; Murad y cols. 2012). Los mecanismos asociados al ejercicio físico y adaptaciones a nivel reflejo y neural en HFrEF han sido ampliamente estudiados (Antonicelli y cols. 2016; Besnier y cols. 2017; Gao y cols. 2007) demostrándose tener efectos beneficiosos en la recuperación del desbalance autonómico (Antonicelli y cols. 2016; Besnier y cols. 2017; Gao y cols. 2007; Hsu y cols. 2015; La Rovere y cols. 2002; Murad y cols. 2012). Sin embargo, hasta ahora no se han descrito en su totalidad los mecanismos reflejos y neuronales, asociados a los efectos beneficiosos del ejercicio físico en modelos experimentales de HFpEF.

Se ha observado que en modelos experimental de HFrEF, el ejercicio físico restablece el control autonómico y mejora la ganancia del BRS cardíaco (Gao y cols. 2007). También se demostró que las adaptaciones positivas al ejercicio serian dependientes del incremento en la expresión de la Cu/Zn-SOD y de la Mn-SOD y de la disminución de la actividad de la NOX2 en la RVLM (Gao y cols. 2007). De manera interesante, se ha mostrado que después de un programa de ejercicio físico conejos con HFrEF presentan una disminución de la descarga quimiosensorial en normoxia y durante la estimulación con hipoxia (Sun y cols. 1999). Estos resultados en su conjunto sugieren que los efectos beneficiosos de un programa crónico de ejercicio físico sobre la fisiopatología de animales con HFrEF, estarían relacionados a la normalización de la ganancia del quimiorreflejo carotideo y la disminución del nivel de estrés oxidativo en la RVLM.

Por el contrario, a lo que se sabe en HFrEF, la evidencia experimental relacionada a los efectos terapéuticos del ejercicio físico sobre la progresión de la HFpEF es controversial (Bowen y cols. 2015; Edelman y cols. 2011). Se ha descrito que pacientes que padecen HFpEF presentan una reducción en la performance aeróbica medido por consumo máximo de O₂ (VO₂peak) (<25 ml·kg·min⁻¹) (Pardaens y cols. 1997; Mancini y cols. 1991; Weber y cols. 1982) o por el test de caminata de 6 minutos (< 300 m) (Cahalin y cols. 1996). Los pacientes que padecen HFpEF, poseen un VO₂peak entre un 30-70% más bajo en comparación a sujetos sanos del mismo peso, edad y sexo (Haykowsky y cols. 2012).

Entrenamientos de caminata de 12 (Gary 2006) y 16 (Kitzman y cols. 2010) semanas de duración han mostrado ser eficaces en aumentar la performance aeróbica ($VO_2\text{peak}$) sin cambios significativos en la morfología cardíaca (Kitzman y cols. 2010). Además, se ha demostrado que pacientes con HFpEF el incremento de la capacidad aeróbica por el mismo tipo de entrenamiento físico (caminatas), no mejora significativamente la función cardíaca (Bowen y cols. 2015). Sin embargo, Edelmann y cols. (2011), utilizando un protocolo de ejercicio diseñado para aumentar “endurance/resistencia”, reportaron que el entrenamiento aeróbico mejora parcialmente la elastancia del corazón y disminuye la hipertrofia ventricular izquierda en pacientes con HFpEF. Además, Angadi y cols. (2014) sugieren que la intensidad del programa de ejercicio de tipo “endurance/resistencia” es clave para el mejoramiento del $VO_2\text{peak}$ y la función cardíaca en pacientes con HFpEF. Estos resultados muestran que los efectos terapéuticos del ejercicio físico en HFpEF son dependientes del patrón e intensidad del entrenamiento. Más aún, la evidencia de que distintos patrones de ejercicio tienen efectos moderados en la performance aeróbica (7 a 10%) y disimiles en la función cardíaca, hace pensar que existen mecanismos distintos que se ven activados por el tipo de patrón de ejercicio. Sin embargo, en HFpEF no se sabe cuáles son los mecanismos relacionados a los efectos beneficiosos del ejercicio físico. Por otro lado, en HFrEF el ejercicio físico de tipo “endurance/resistencia” de intensidad moderada, disminuye la actividad de neuronas pre-simpáticas en la RVLM, disminuye el tono simpático, disminuye la ganancia del

quimiorreflejo carotideo y aumenta el BRS cardíaco. Por lo tanto, es posible hipotetizar que la restauración del balance autonómico en HFrEF sería un mecanismo importante por el cual el ejercicio físico mejora la calidad de vida y la función cardíaca de estos pacientes.

Tomando en consideración que en modelos preclínicos de HFrEF en ratas y conejos (Gao y cols., 2004; Gao y cols., 2007) se ha descrito que el estrés oxidativo en la RVLM juega un rol fundamental en el aumento del control simpático, el deterioro de la función cardíaca y la incidencia de eventos arrítmicos, y que en HFpEF no se conoce cual es el rol de la RVLM en su fisiopatología, es que me propuse estudiar la contribución de RVLM en el desbalance autonómico, la disfunción cardíaca y la arritmogenesis cardíaca en un modelo de HFpEF por sobrecarga de volumen. Por otra parte, en HFpEF no se ha descrito el efecto del ejercicio físico de tipo “endurance/resistencia” de intensidad moderada sobre el estrés oxidativo de neuronas pre-simpáticas del RVLM y el control autonómico cardíaco durante la progresión de la HFpEF. Por lo tanto, el objetivo principal de mi tesis doctoral es determinar los efectos del ejercicio físico de tipo “endurance/resistencia” de intensidad moderada sobre i) el nivel de estrés oxidativo en neuronas pre-simpáticas de la RVLM, ii) el desbalance autonómico cardíaco, iii) el quimiorreflejo ventilatorio hipóxico, iv) la sensibilidad del barorreflejo cardíaco, v) el remodelamiento cardíaco, y vi) la función cardíaca en un modelo de HFpEF en ratas.

5.- HIPOTESIS

“El ejercicio físico disminuye el estrés oxidativo en neuronas pre-simpáticas del RVLM, restaurando el control autonómico y mejorando la función cardíaca en ratas con HFpEF”

6.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del ejercicio físico en: i) el nivel de estrés oxidativo en neuronas pre-simpáticas del RVLM, ii) balance autonómico, iii) ganancia del quimiorreflejo ventilatorio hipóxico e hipercápnic, y barorreflejo cardíaco, iv) remodelamiento y función cardíaca, y v) la “performance” aeróbica en animales con HFpEF.

6.1.- Objetivos específicos

6.1.1.- Determinar el nivel de estrés oxidativo en neuronas pre-simpáticas de la RVLM en ratas con HFpEF.

6.1.2.- Determinar el balance autonómico, la función quimiorrefleja ventilatoria a la hipoxia, a la hipercapnia y la ganancia del barorreflejo cardíaco en ratas con HFpEF.

6.1.3.- Determinar el remodelamiento cardíaco y la función cardíaca en ratas con HFpEF.

6.1.4.- Determinar si un programa de ejercicio físico disminuye el estrés oxidativo y la actividad de neuronas pre-simpáticas de la RVLM, la ganancia quimiorrefleja periférica y central, y la ganancia del barorreflejo cardíaco, el remodelamiento cardíaco, el metabolismo del colágeno, y si “mejora” la función cardíaca y la performance aeróbica en un modelo de HFpEF.

6.1.5.- Determinar la contribución del cuerpo carotídeo sobre el grado de tolerancia al ejercicio físico en ratas con HFpEF.

7.- MATERIALES

Animales.

Ratas Sprague Dawley adultos machos (~250 g) se usaron en la presente investigación. Los protocolos experimentales fueron previamente aprobados por los Comités de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile y del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chile en el marco del Proyecto Fondecyt #1140275.

Procedimientos quirúrgicos con sobrevivencia.

Modelo de insuficiencia cardíaca.

Para inducir HFpEF, las ratas fueron anestesiadas con 2% isoflurano balanceado en 98% O₂ y luego se realizó una incisión en la zona media del abdomen para dejar expuesta la aorta abdominal y la vena cava inferior. Estos vasos fueron ocluidos y perforados con una aguja de calibre 19G. Se generó una fistula arteriovenosa (Abassi y cols. 2011), la cual fue confirmada por el ingreso de sangre a la vena cava a través de la anastomosis. La cavidad abdominal fue cerrada en capas y planos musculares con una sutura absorbible. Los animales Sham fueron sometidos al mismo procedimiento, pero sin realizar la anastomosis entre estos vasos. Luego de la cirugía, a los animales se les administró Enrofloxacino (5% subcutáneo) y Ketoprofeno (1% subcutáneo).

Instalación de radiotelémetros para la medición de presión arterial y frecuencia cardíaca.

Los animales fueron anestesiados (2% isoflurano, y 98% O₂) y luego se realizó un corte en la zona interna del muslo izquierdo para visualizar y aislar la arteria femoral (Del Rio y cols. 2013; Del Rio y cols. 2016). Luego se procedió a la instalación de un radiotelémetro HDS10 (Data Science International, USA). Las incisiones de la parte ventral y dorsal se suturaron con hilo quirúrgico absorbible. Luego de la cirugía, a los animales se les administró subcutáneamente Enrofloxacino (5% subcutáneo) y Ketoprofeno (1% subcutáneo).

Ablación de las neuronas de la RVLM.

A las 4 semanas de la cirugía para inducir HFpEF o Sham, los animales fueron sometidos a una segunda intervención, donde se destruyeron las neuronas C1 de la RVLM, de manera similar a lo reportado por otros investigadores (Malheiros-Lima et al. 2017; Schreihöfer et al. 2000). Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (100mg/kg i.p.) con xilasina (10mg/kg i.p), para posteriormente ser fijadas en un estereotáxico (modelo 900; David Kopf Instruments, USA). Luego se procedió a realizar una inyección bilateral de dopamina-beta-hidroxilasa conjugada con la toxina saporina (D β H-SAP [Advanced Targeting Systems, USA]) en la RVLM (12.36 mm caudal a bregma, 2.3 mm lateral a la línea media, y 8.5 mm bajo el cráneo, ver atlas de Paxinos et al. 1980), con la intención de destruir las neuronas C1 de esta región. La inyecciones se realizaron con una jeringa Hamilton (500

nl) con una punta calibre 32. La dosis de la toxina D β H-SAP fue de 7.5 ng/150nl (Schreihöfer et al. 2000; Wenker et al. 2013). El vehículo fue solución salina estéril (NaCl 0.9%/100nl). Luego de la cirugía, a los animales se les administró Enrofloxacino (5% subcutáneo) y Ketoprofeno (1% subcutáneo).

Ablación del cuerpo carotideo

La destrucción selectiva de los CB fue realizada en animales Sham y en animales HFpEF tolerantes al ejercicio físico (animales que lograron completar más del 50% de las sesiones de entrenamiento programadas), similar a lo realizado previamente (Del Rio y cols. 2013; 2016). Dos semanas antes de que terminará el protocolo de entrenamiento las ratas HFpEF tolerantes al ejercicio físico fueron sometidas a la ablación bilateral de los CB. Brevemente, los animales fueron anestesiados con isoflurano 2% en 98% de O₂. Luego se procedió a realizar una incisión en la zona de anterior del cuello (~2 cm), para después exponer ambos CB. Cuando los CB fueron visualizados se procedió a destruirlos selectivamente con pinzas de punta fina previamente enfriadas en N₂ líquido (Del Rio y cols. 2013; 2016). Después de la cirugía los animales fueron inyectados con Enrofloxacino (5% s.c) y Ketoprofeno (1% s.c).

Control autonómico cardíaco

Ensayo de atropina y propranolol

Después de una semana de la instalación de los transmisores radio telemétricos se procedió a la administración, por vía intravenosa (vena yugular) o por vía peritoneal de propranolol (1 mg/kg) para producir una respuesta bradicardia y de atropina (1 mg/kg) para producir una respuesta taquicardia (Del Rio y cols. 2016). Se cuantificaron los cambios de frecuencia cardíaca (ΔHR) con respecto a un registro basal de 1 hora.

Medición del barorreflejo cardíaco.

El barorreflejo cardíaco espontáneo (BRS) fue evaluado a través del método de las secuencias (Software HemoLab) (Rey y cols. 2008; Del Rio y cols. 2013; 2016). La ganancia del BRS fue determinado a través de la cuantificación de los cambios de HR gatillados por la BP. De esta manera, se buscaron grupos de secuencias donde al aumentar BP y la HR disminuía y viceversa. Los ciclos fueron determinados en 10 minutos de registro continuo y solo las secuencias que cumplieran con un coeficiente de correlación $r > 80\%$ fueron usadas (Rey y cols. 2008).

Variabilidad del ritmo cardíaco (HRV)

Desde el registro de BP. Con una frecuencia de adquisición 1.000 Hz, se obtuvo la primera derivada (dP/dt) y el tiempo entre cada pico fue tomado como un intervalo R-R. El HRV fue evaluado en registros de 10 minutos en el dominio de la frecuencia en forma similar a otros estudios (Del Rio y cols. 2010; 2013; 2016). El HRV fue analizado con el módulo de HRV

de LabChart 7.0-Pro. El poder espectral de la variabilidad entre los intervalos R-R fue obtenido utilizando el algoritmo de la transformada rápida de Fourier (FFT), después de haber aplicado una ventana Hann. Además, se calculó la potencia espectral en el dominio tiempo continuo variable por medio del método de Kalman (coeficiente de adaptación= 0.0001), con una resolución de 2-s. La potencia espectral de los intervalos R-R fueron evaluados utilizando las siguientes bandas de frecuencia: muy baja frecuencia: -0,04 Hz, baja frecuencia (LF): 0,04-0,6 Hz y alta frecuencia (HF): 0,6-2,4 Hz (68, 69) (Del Rio y cols. 2010; Lai y cols. 2006). Además, se calculó la razón LF/HF como indicador del balance autonómico.

Registro del quimiorreflejo ventilatorio en ratas con HFpEF.

Para evaluar las respuestas quimiorreflejas periféricas y centrales, los animales respiraron distintos niveles de O₂ (F_iO₂ 10-12%) y CO₂ (F_iCO₂ 7% + 93% O₂), respectivamente (Granjeiro y cols. 2009; Braccialli y cols. 2008; Almado y Machado 2005; Del Rio y cols. 2013; Marcus y cols. 2014). Las estimulaciones hipóxicas e hipercápnicas duraron 10 minutos cada una y se midieron las respuestas en triplicado (10 ciclos respiratorios por cada una) por cada nivel de exposición. Brevemente, los animales fueron introducidos a un pletismógrafo de cuerpo entero (EMKA Technologies) por 30 minutos antes de comenzar las estimulaciones hipoxias e hipercapnias. En el pletismógrafo se registró el volumen corriente (V_T) y la frecuencia respiratoria (f_{ra.}), y se calculó el volumen minuto (V_T · f_{ra.}= V_E). Las

señales fueron digitalizadas en un computador con el software IOX2 (EMKA Technologies).

La frecuencia de adquisición de datos fue de 1.000 Hz. Las respuestas ventilatorias a la hipoxia y a la hipercapnia se expresaron como valores crudos y las ganancias (o pendientes) se obtuvieron de acuerdo a las siguientes funciones lineales:

$$HVR = \frac{FiO_2 - \beta}{V_E} \quad (1)$$

$$HCVR = \frac{FiCO_2 - \beta}{V_E} \quad (2)$$

Donde HVR es la pendiente (ganancia) de la respuesta ventilatoria a la hipoxia y HCVR es la pendiente ganancia) de la respuesta ventilatoria a la hipercapnia y β representa el intercepto de la recta.

Función cardíaca.

Ecocardiografía

La ecocardiografía se realizó en todos los experimentos a las 2, 4 y 8 semanas después de inducir la insuficiencia cardíaca. Las mediciones fueron realizadas 48 horas después de la última sesión de ejercicio físico, para disminuir el efecto agudo del entrenamiento. Bajo condiciones de anestesia (2% isoflurano en 98% O₂) los animales fueron escaneados con un ecocardiógrafo en modo-M (Samsung Medison, Seoul, Republica de Korea), con un

transductor de 12MHz. Las imágenes fueron obtenidas a nivel del ventrículo izquierdo (LV) en una vista en el eje corto acorde a las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Schiller y cols. 1989). Los parámetros medidos fueron: diámetro de fin de diástole (LVEDD) y diámetro de fin de sístole (LVESD). Desde los diámetros diastólico y sistólico se calculó: volumen de fin de diástole (LVEDV, Formula 3), volumen de fin de sístole (LVESV, Formula 4), volumen eyectado (SV, Formula 5), fracción eyectada (EF, Formula 6) y fracción de acortamiento (FS, Formula 7). El criterio para determinar si es que un animal estaba o no en insuficiencia cardíaca, fueron: un SV y LVEDV por sobre dos desviaciones estándar con respecto a un animal Sham y una EF >50%.

$$LVEDV = \frac{7 \cdot LVEDD^3}{(2.4 + LVEDD)} \quad (3)$$

$$LVESV = \frac{7 \cdot LVESD}{(2.4 + LVESD)} \quad (4)$$

$$SV = (LVEDV - LVESV) \quad (5)$$

$$EF = 100 \cdot \frac{(LVEDV - LVESV)}{(LVEDV)} \quad (6)$$

$$FS = 100 \cdot \frac{(LVEDD - LVESD)}{(LVEDD)} \quad (7)$$

“Loops presión-volumen”

Los animales se anestesiaron con una mezcla de uretano (800 mg/kg) y α -cloralosa (55 mg/kg) (Pacher y cols. 2008) y se les realizó una traqueotomía. Luego se realizó una incisión en la zona abdominal y la fistula arteriovenosa fue visualizada. Un hilo 5-0 fue deslizado por debajo de la vena cava para la realización de la oclusión de este vaso (disminución de la precarga). Un catéter de conductancia (Millar Instruments) fue introducido por la arteria carótida derecha hasta el LV (Cingolani y cols. 2004; Pacher y cols. 2008; Rommel y cols. 2016). Adicionalmente, otro catéter fue introducido en la vena yugular para realizar la calibración de la conductancia en paralelo del LV, a través de un bolo de 50 μ l de NaCl al 30% (Formula 8) (Pacher y cols. 2008). Además de la calibración con una solución hipertónica, se realizó la calibración del volumen del ventrículo izquierdo por medio del método de las cubetas (Formula 9) (Pacher y cols. 2008). Luego de un periodo de estabilización del catéter dentro del ventrículo (15 min), se comenzó el registro basal de loops presión-volumen de 25 minutos. La función cardíaca fue determinada por medio de la relación presión volumen de fin de sístole (ESPVR, ajuste lineal) (Formula 10) y la relación presión volumen de fin de diástole (EDPVR, ajuste exponencial) (Formula 11), la cual es obtenida durante la oclusión de la vena cava (Pacher y cols. 2008). El análisis de los datos fue realizado con el software LabChart 7 pro (ADInstruments).

$$G_{ES} = m \cdot G_{ED} + \beta$$

(8)

Donde G_{ES} es la conductancia de fin de sístole, m representa la pendiente, G_{ED} representa la conductancia de fin de diástole y β representa el intercepto de la recta. Así, el punto donde el ajuste lineal se cruza con la línea de identidad es el punto donde $G_{ES} = G_{ED}$, lo que implica que la señal se deriva completamente del músculo cardíaco (G_p).

$$Volumen = \frac{pL^2}{\alpha} (G - G_p) \quad (9)$$

Donde p es la resistividad de la sangre, L representa el largo entre los electrodos del catéter, α representa una constante de corriente uniforme del campo eléctrico entre los electrodos ($\alpha = 1$), G es la conductancia total y G_p es a la conductancia del músculo cardíaco.

$$ESPVR = \frac{LVESP - \beta}{LVESV} \quad (10)$$

Donde el $LVESP$ es la presión de final de sístole del ventrículo izquierdo, β es el intercepto de la recta y el $LVESV$ representa el volumen de final de sístole del ventrículo izquierdo.

$$EDPVR = \alpha \cdot \exp(\beta \cdot LVEDV) \quad (11)$$

Donde α representa la contante de curvatura, β representa una constante de rigidez del ventrículo izquierdo y el $LVEDV$ representa el volumen de final de diástole del ventrículo izquierdo.

Función cardíaca por análisis de un ciclo cardíaco (single beat analysis)

Además de evaluar la función cardíaca a través de los ajustes lineales y exponencial durante la oclusión de la vena cava, se determinó la función cardíaca por medio del análisis de un solo ciclo cardíaco (single beat analysis) (Takeushi et al. 1991; ten Brinke et al. 2010). Así, la función cardíaca sistólica, representada por el ESPVR fue calculada por medio de la estimación de la presión máxima predicha para el LV, a través de la quinta polinomial, obtenida desde los peak del dp/dt max y min de la presión del LV. Luego, en base a los LVESV y LVESP se calculó el ESPVR por medio de un ajuste lineal (Formula 12):

$$ESPVR = \frac{LVESP - \beta}{LVESV} \quad (12)$$

donde el $LVESP$ representa la presión de final de sístole del ventrículo izquierdo, β representa el intercepto de la recta y el $LVESV$ representa el volumen de final de sístole del ventrículo izquierdo.

Por otro lado, la función cardíaca diastólica también fue determinada por medio del análisis de un solo ciclo cardíaco (Klotz et al. 2006; 2007). A través de los experimentos de PV loop (ver metodología de *loop presión-volumen*), desde un ciclo cardíaco se obtuvo la presión y volumen de final de diástole del ventrículo izquierdo (LVEDP y LVEDV). Luego se procedió al cálculo del volumen a presión 0 (V_0), el cual representa el volumen donde el LVEDP es 0 mmHg y del volumen a presión 30 (V_{30}), el cual representa el volumen donde el LVEDP es 30 mmHg. Lo primero fue la normalización del LVEDV ($LVEDV_n$):

$$LVEDV_n = \frac{(LVEDV - V_0)}{(V_{30} - V_0)} \quad (13)$$

$$V_{30} = V_0 + \frac{(LVEDV_n - V_0)}{(LVEDP - A_n)^{(1-\beta_n)}} \quad (14)$$

$$V_0 = LVEDV_m \cdot (0.6 - 0.006 \cdot LVEDP_m) \quad (15)$$

Donde $LVEDV_m$, representa el $LVEDV$ medido desde el catéter y EL $LVEDP_m$, es el $LVEDP$ medido desde el ventrículo. Luego de esto y para forzar la curva de que pase por V_0 y V_{30} , se determinó α y β .

$$\alpha = \frac{30}{V_{30}^{\{[\log(LVEDP_m)]/[\log(\frac{LVEDV_m}{V_{30}})]\}}} \quad (16)$$

$$\beta = [\log(\frac{LVEDP_m}{30})/\log(LVEDV_m/V_{30})] \quad (17)$$

Para finalizar y poder obtener una serie de datos que de $LVEDP$ y de $LVEDV$, las cuales tenga un comportamiento exponencial, se utilizan los valores de α y β obtenidos desde las fórmulas 14 y 15.

$$EDPVR = \alpha \cdot LVEDV^\beta \quad (18)$$

Incidencia de arritmias

La frecuencia cardíaca (HR) fue obtenida desde el cálculo de la primera derivada de la presión arterial (Del Rio y cols. 2013; 2016). Los ciclos cardíacos irregulares fueron visualmente inspeccionados en todas las condiciones experimentales. Los episodios arrítmicos fueron definidos como cualquier ciclo que sea superior o inferior a 3 desviaciones estándar con respecto a la media de la HR. Adicionalmente se evaluó la contribución simpática sobre la incidencia de arritmias por medio de la administración de propanolol (1mg/kg ap.) (Del Rio y cols. 2013; 2016). Las arritmias fueron cuantificadas como eventos/hora.

Immunoblots

Western blot de MMP2 y TIMP2

Luego de 8 semanas, se procedió a sacrificar a los animales por medio de una sobredosis de anestésico (Pentobarbital 60mg/kg). Después de sacrificar a los animales, los corazones fueron removidos, pesados y congelados rápidamente en hielo seco y almacenado a -80 ° C, para su posterior procesamiento. Los ventrículos izquierdos de los animales fueron lisados con buffer RIPA + 1% de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, USA) y sonicados al 20% de la potencia máxima durante 2 minutos a 4°C (Onmi, instruments). Las muestras fueron centrifugadas a 12000-rcf por 30 minutos a 4°C. Luego el sobrenadante fue resuspendido y

posteriormente la concentración de proteínas se determinó mediante cuantificación con BCA (Thermo Scientific, USA). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis. Para poder determinar la expresión de proteínas, se realizó una separación electroforética, para lo cual se cargaron 50- μg de proteína por pocillo en geles nu-page Bis-Tris de poliacrilamida al 10% (Life Technologies, USA) embebidos en tampón MES 1X (Life Technologies, USA). La corrida electroforética se realizó a 165 V a amperaje constante (600 mA totales), durante 35 min. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Life Technologies, USA) utilizando el sistema electroforético NOVEX junto con el tampón de transferencia 1X recomendado por el fabricante (Life Technologies, USA). Este proceso se realizó a 20V y con amperaje constante, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas fueron incubadas con un buffer de bloqueo (BSA al 3% en TBS) (Thermo Scientific, USA) y luego fueron incubadas toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-MMP2 (1:1000, Novus, USA) seguido por la incubación de 1 hora con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo-HRP (1:2000, Thermo Scientific, USA). Las membranas fueron reveladas con solución ECL PicoWest (Thermo Scientific, USA) y la captura de imágenes se realizó en el equipo UVP Doc-It® (Life Science Software, USA). Para analizar TIMP2 se realizó el stripping de las membranas por 5 minutos con la solución Western blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, USA), luego se bloqueó por 1 hora con solución de bloqueo (BSA al 3% en TBS) (Thermo Scientific,

USA) y luego fueron incubadas toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-TIMP2 (1:500, Novus, USA) seguido por la incubación de 1 hora con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo-HRP (1:2000, Thermo Scientific, USA). Las membranas fueron reveladas con solución ECL PicoWest (Thermo Scientific, USA). El análisis de las densidades ópticas de las bandas específicas fue realizado con el software ImageJ (National Institute of Health, USA). Los niveles relativos de proteínas fueron calculados como la razón MMP2/TIMP2. Luego de hacer un stripping de la membrana se reveló contra el anticuerpo anti-GAPDH (housekeeping) (Anticuerpo monoclonal de ratón 1:5000, Sigma).

Activación crónica del RVLM

La activación crónica neuronal se estudió mediante la cuantificación de la expresión relativa del marcador de actividad Fos-b, en micropunches obtenidos de la RVLM, a través de inmunoblot (Haack y cols. 2012; Del Rio y cols. 2013). Luego de 8 semanas, se procedió a sacrificar a los animales por medio de una sobredosis de Pentobarbital (60 mg/kg). Después de sacrificar a los animales, los cerebros fueron removidos y rápidamente congelados en hielo seco y almacenados a -80°C, para su posterior procesamiento. Los cerebros fueron cortados en un criostato hasta llegar a la zona de interés, luego de esto se tomaron micropunches que contenían la RVLM. Luego los micropunches que contenían la RVLM fueron lisados con buffer RIPA + 1% de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, USA) y sonicados al 20% de la potencia máxima durante 2 minutos a 4°C (Onmi, instruments). Las muestras fueron

centrifugadas a 12000-rcf por 30 minutos a 4°C. Luego el sobrenadante fue resuspendido y posteriormente la concentración de proteínas se determinó mediante cuantificación con BCA (Thermo Scientific, USA). Para poder determinar la expresión de proteínas, se realizó una separación electroforética, en la cual se cargaron 50ug de proteína por pocillo en geles nu-page Bis-Tris de poliacrilamida al 10% (Life Technologies, USA) embebidos en tampón MES 1X (Life Technologies, USA). La corrida electroforética se realizó a 165 V a amperaje constante, durante 35 min. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Life Technologies, USA) utilizando el sistema electroforético NOVEX junto con el tampón de transferencia 1X requerido por el fabricante (Life Technologies, USA). Este proceso se realizó a 20V y con amperaje constante (600 mA), durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas fueron incubadas con un buffer de bloqueo (BSA al 3% in PBS) (Thermo Scientific, USA) y luego incubadas toda la noche a 4°C con un anticuerpo mouse monoclonal anti-Fos-b (1:250, Santa Cruz, USA) seguido por la incubación de 1 hora con un anticuerpo secundario anti-mouse-HRP (1:2000, Thermo Scientific, USA). Las membranas fueron reveladas con solución ECL PicoWest (Thermo Scientific, USA) y la captura de imágenes se realizó en el equipo UVP Doc-It® (Life Science Software, USA). El análisis de las densidades ópticas de las bandas específicas fue realizado con el software ImageJ (National Institute of Health, USA). Luego de hacer un stripping de la membrana se incubo

con el anticuerpo anti- β -actina (Anticuerpo monoclonal de ratón 1:5000, Sigma-Aldrich, USA), el cual fue utilizado como housekeeping.

Inmunohistoquímica

Medición de ROS en la RVLM

La producción endógena de ROS en la RVLM se midió cuantificando cuantificación de la fluorescencia emitida por dihidroetidio (DHE) (Sigma-Aldrich, USA), similar a lo realizado en investigaciones previas (Gao y cols. 2004; Banes y cols. 2005; Oliveira-Sales y cols. 2010). Luego de 8 semanas, se procedió a sacrificar a los animales por medio de una sobredosis de Pentobarbital (60 mg/kg). Después de sacrificar a los animales, los cerebros fueron removidos y rápidamente congelados en hielo seco y almacenados a -80°C , para su posterior procesamiento. Los cerebros fueron cortados en un criostato hasta llegar a la zona de interés. Se realizaron cortes de $30\text{ }\mu\text{m}$ y posteriormente fueron incubados con DHE ($1\text{ }\mu\text{M}$) en oscuridad por 30 min a 37°C . Luego, los cortes fueron montados con el medio de montaje con DAPI (Vectashield), para visualizar los núcleos celulares. Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio de epifluorescencia y con el software ImageJ (National Institute of Health, USA). En algunos casos, para co-localizar la producción de ROS, los cortes de cerebro fueron fijados en 4% PFA post-incubación con DHE y se realizó detección con inmunofluorescencia de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (para más detalle mirar

metodología inmunofluorescencia), que es un marcador de neuronas pre-simpáticas catecolaminérgicas de la RVLM.

Inmunofluorescencia.

Dependiendo si la inmunofluorescencia fue realizada para detectar ROS por DHE junto con TH o solo TH para el conteo de neuronas de la RVLM, los cerebros fueron extraídos y congelados o fijados por perfusión con solución salina (NaCl 0.9%) y 4% PFA, respectivamente. Luego de 8 semanas, se procedió a sacrificar a los animales por medio de una sobredosis de Pentobarbital (60 mg/kg). Después de sacrificar a los animales, los cerebros fueron removidos y rápidamente congelados en hielo seco y almacenados a -80°C, para su posterior procesamiento. Por otro lado, para el protocolo de conteo de neuronas se tomó al animal, se le abrió la cavidad torácica y con una aguja por el ventrículo izquierdo se le administro durante 15 minutos NaCl 0.9%, para luego pasar a una solución de PFA al 4%. El cerebro fue extraído, mantenido 2 horas en PFA, para luego pasar a sacarosa al 30% para su crio preservación. Posteriormente, los cerebros fueron embebidos en OCT y cortados en un criostato para llegar a la zona de interés (RVLM). Los cerebros se cortaron con un espesor de 20 μm y se colocarán sobre portaobjetos de microscopio cargado electrostáticamente (Superfrost, VWR Scientific, USA). Las secciones cerebrales que contienen la región del RVLM se incubarán con un anticuerpo monoclonal anti-TH y un anticuerpo secundario para IgG de ratón acoplado a Alexa-564. Luego fueron montados con un medio de montaje

(Vectashield, Mounting Media). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de epifluorescencia de alta resolución Leica o con microscopia confocal y las imágenes fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ a través del conteo de neuronas TH positivas (NIH, Bethesda, USA).

Remodelamiento cardíaco

Luego de 8 semanas, se procedió a sacrificar a los animales por medio de una sobredosis de Pentobarbital (60 mg/kg). Después de sacrificar a los animales, los corazones fueron extraídos, pesados y fijados en PFA 4%, para luego ser incluidos en parafina. Luego los cortes fueron deshidratados con Xilol. Luego los cortes fueron rehidratados pasando por una serie de soluciones decrecientes de alcohol étílico hasta llegar a 100% de H₂O. Luego las muestras fueron tratadas con una solución Sirius rojo (Sigma) por 60 minutos y montadas con un medio de montaje, para realizar su posterior análisis por microscopia de campo claro (Del Rio y cols. 2013). Se realizaron cortes transversales de los ventrículos (5 µm) en un para determinar contenido de colágeno mediante la tinción de Picro Sirius rojo. Las imágenes fueron analizadas por medio de la cuantificación de las deposiciones de colágeno del ventrículo izquierdo con el software ImageJ (National Institute of Health, USA). Los datos fueron expresados como % del área total.

Protocolos de ejercicio.

Protocolo de entrenamiento.

Dos semanas después de la generación de la fistula arteriovenosa y de los experimentos de ecocardiografía, los animales fueron sometidos a ejercicio continuo en una cinta rodante 5 veces/semana por 6 semanas. Inicialmente, se utilizó una baja velocidad (10 m/min), grado (0%) y duración (10 min/día) para familiarizar a las ratas a correr en la cinta rodante. La velocidad, duración y grado fueron incrementadas gradualmente entre 20 a 25 m/min, 60 min/día y 5 a 10% de inclinación, respectivamente (Kleiber y cols. 2008). Las ratas de los grupos experimentales sedentario (HFpEF y Sham), fueron alojadas en la cinta rodante, pero sin ser ejercitadas.

Performance aeróbica en animales controles

El protocolo utilizado para determinar el rendimiento aeróbico fue similar a los realizados por otros investigadores (Veskoukis y cols. 2008). Brevemente, los animales fueron sometidos a un protocolo de nado libre en un tanque de agua (1 metro de profundidad, 30 cm de diámetro). El protocolo consistía en sesiones de ambientación (3 sesiones de 5, 20 y 50 minutos de nado libre con el propio peso corporal (aprendizaje). La temperatura del agua se mantuvo entre 23 a 25° en todas las sesiones de ambientación y evaluación. Luego se procedió a evaluar la performance aeróbica con un peso de ~4% del peso corporal. Este procedimiento se realizó antes y dos semanas después de la ablación selectiva de los CB.

Análisis estadístico.

Los resultados se presentan como promedio $\pm$ error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas se analizaron por medio de una ANOVA de una o dos vías, de acuerdo a la estructura de los datos, seguido de un análisis post hoc de Holm-Sidak a dos colas. Para las comparaciones por pares se utilizó el test T de student para muestras no pareadas. El nivel de significancia estadística fue definido con un $p < 0,05$. El software estadístico utilizado fue GraphPad Prism 7.0.

8.- RESULTADOS

8.1.- Los animales con HFpEF presentan hipertrofia cardíaca, mayor deposición de colágeno en el ventrículo izquierdo y deterioro de la función cardíaca sistólica y diastólica.

El diseño experimental se muestra en la Figura 1. A la semana 0 se induce la HFpEF, se esperan 8 semanas y se realizan los experimentos fisiológicos (Figura 1). Por medio de ecocardiografía se observó que los animales con HFpEF presentan un incremento en el diámetro de la cámara del ventrículo izquierdo en sístole (3.18 ± 0.21 vs. 1.80 ± 0.04 mm, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 2A y B) y en diástole (8.00 ± 0.37 vs. 5.06 ± 0.15 mm $p < 0.05$, CHF vs. animales Sham, respectivamente, Figura 2A y C). Además, encontré que la fracción de acortamiento (FS) y la fracción eyectada (EF) no fueron significativamente diferentes entre los animales HFpEF comparado con los animales del grupo Sham (FS: 59.56 ± 2.61 vs. 63.98 ± 1.26 % $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente; EF: 85.32 ± 1.93 vs. 91.67 ± 0.68 % $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente; Figura 2D y E, respectivamente).

El remodelamiento cardíaco en HFpEF fue determinado por los depósitos de colágeno en el ventrículo izquierdo y la hipertrofia cardíaca expresada como peso del corazón respecto del peso corporal (HW/BW). Por medio de la tinción de picro-sirius rojo se observó que los animales con HFpEF mostraban un incremento significativo en el porcentaje del área total de colágeno en comparación a los animales del grupo Sham (7.37 ± 0.57 vs. 4.28 ± 0.31 %, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente).

$p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 3A y B). Por otro lado, se observó que los animales con HFpEF presentaban hipertrofia cardíaca en comparación a los animales Sham (3.9 ± 0.2 vs. 2.9 ± 0.1 mg/g, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 4A y B).

Adicionalmente, se determinaron niveles de expresión de proteínas asociadas al remodelamiento de la matriz colágena en el corazón. Por medio de inmunoblot se observó que los animales con HFpEF presentan un aumento significativo de la metaloproteasa 2 (MMP-2: 0.13 ± 0.001 vs. 0.08 ± 0.01 $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 5A y C) y una disminución no significativa del inhibidor tisular de la metaloproteasa 2 (TIMP2: 0.19 ± 0.01 vs. 0.29 ± 0.01 , $p > 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 5A y B) comparado a los animales Sham. Acorde con estos resultados, los animales con HFpEF presentaron un incremento en la razón MMP2/TIMP2 en comparación a los animales Sham (MMP2/TIMP2: 0.69 ± 0.08 vs. 0.28 ± 0.09 , $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 5A y C).

Mediante el estudio de presión-volumen intra-ventriculares (Figura 6) se observó que las ratas con HFpEF mostraban un incremento significativo de la presión de fin de diástole (LVEDP: 5.61 ± 0.18 vs. 3.87 ± 0.32 mmHg, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente) y sin cambios significativos en la presión de fin de sístole en comparación a los animales Sham (LVESP: 88.12 ± 2.62 vs. 86.52 ± 5.22 mmHg, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente).

Además, se pudo observar un aumento significativo del volumen eyectado (SV) en los animales HFpEF en comparación a los Sham (325.5 ± 20.26 vs. 160.6 ± 10.28 μ l, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente) (Figura 6D), sin cambios significativos de la frecuencia cardíaca (HR: 318.3 ± 16.15 vs. 344.2 ± 11.9 latidos/min, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente) (Figura 6E) y un aumento significativo del gasto cardíaco (CO: 55.5 ± 4.2 vs. 106.5 ± 12.4 ml/min, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente) (Figura 6F). Lo anterior muestra que los animales con HFpEF presentan un deterioro en los parámetros hemodinámicos basales los que sugirió la pérdida de la función cardíaca.

El grado de deterioro de la función cardíaca fue determinado por medio de la oclusión de la vena cava durante el registro de PV-loop. La función cardíaca sistólica fue medida por los cambios en la relación presión-volumen de fin de sístole (ESPVR) durante la disminución de la precarga. Los animales con HFpEF mostraron una disminución significativa del ESPVR en comparación a los animales Sham (0.13 ± 0.03 vs. 0.51 ± 0.11 mmHg/ μ l, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 7A y B). La función cardíaca diastólica se midió por los cambios en la relación presión-volumen de fin de diástole (EDPVR) durante la disminución de la precarga. En comparación a los animales Sham, las ratas con HFpEF mostraron un deterioro significativo de la función diastólica (EDPVR: 0.008 ± 0.001 vs. 0.004 ± 0.001 mmHg/ μ l, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 7A y C). Estos resultados

muestran que en este modelo experimental de HFpEF existe una pérdida de contractibilidad como también un incremento de la tensión pasiva del ventrículo izquierdo.

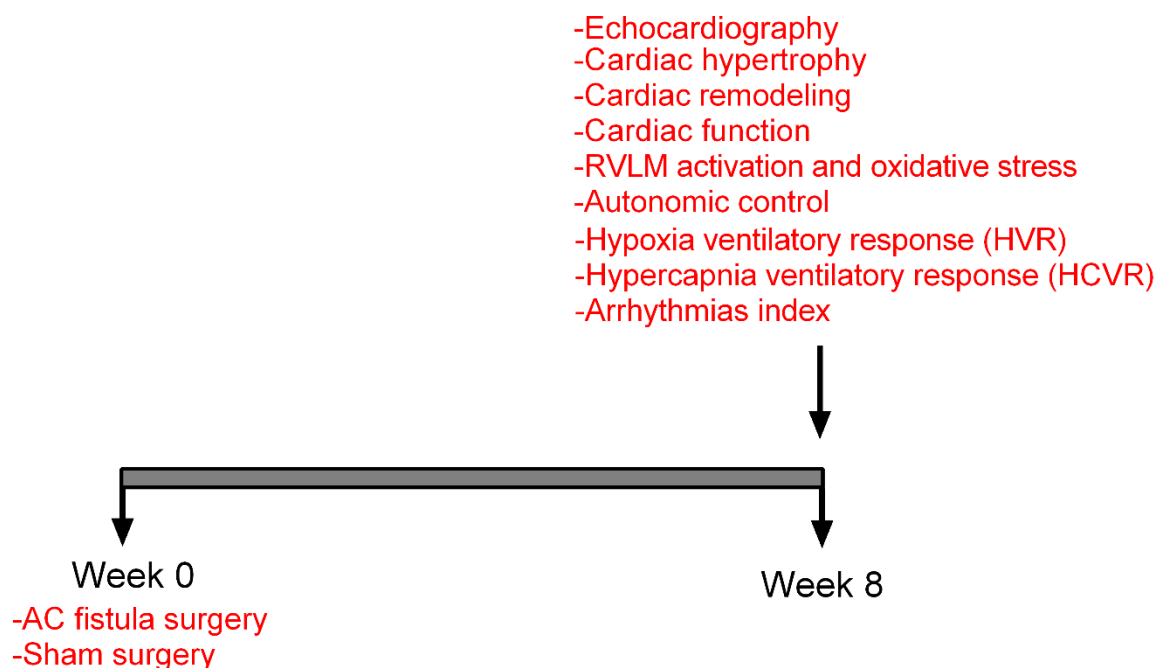


Figura 1. Diseño experimental para determinar las alteraciones cardiorrespiratorias después de inducir la HFpEF. A la semana 0 se indujo la insuficiencia cardíaca, a través de una fístula arteriovenosa (AC). Se esperaron 8 semanas y se evaluó la hipertrofia cardíaca, el remodelamiento cardíaco, la función cardíaca, la activación crónica y estrés oxidativo de la RVLM, el control autonómico, la respuesta ventilatoria a la hipoxia (HVR) y a la hipercapnia (HCVR), y la incidencia de arritmias.

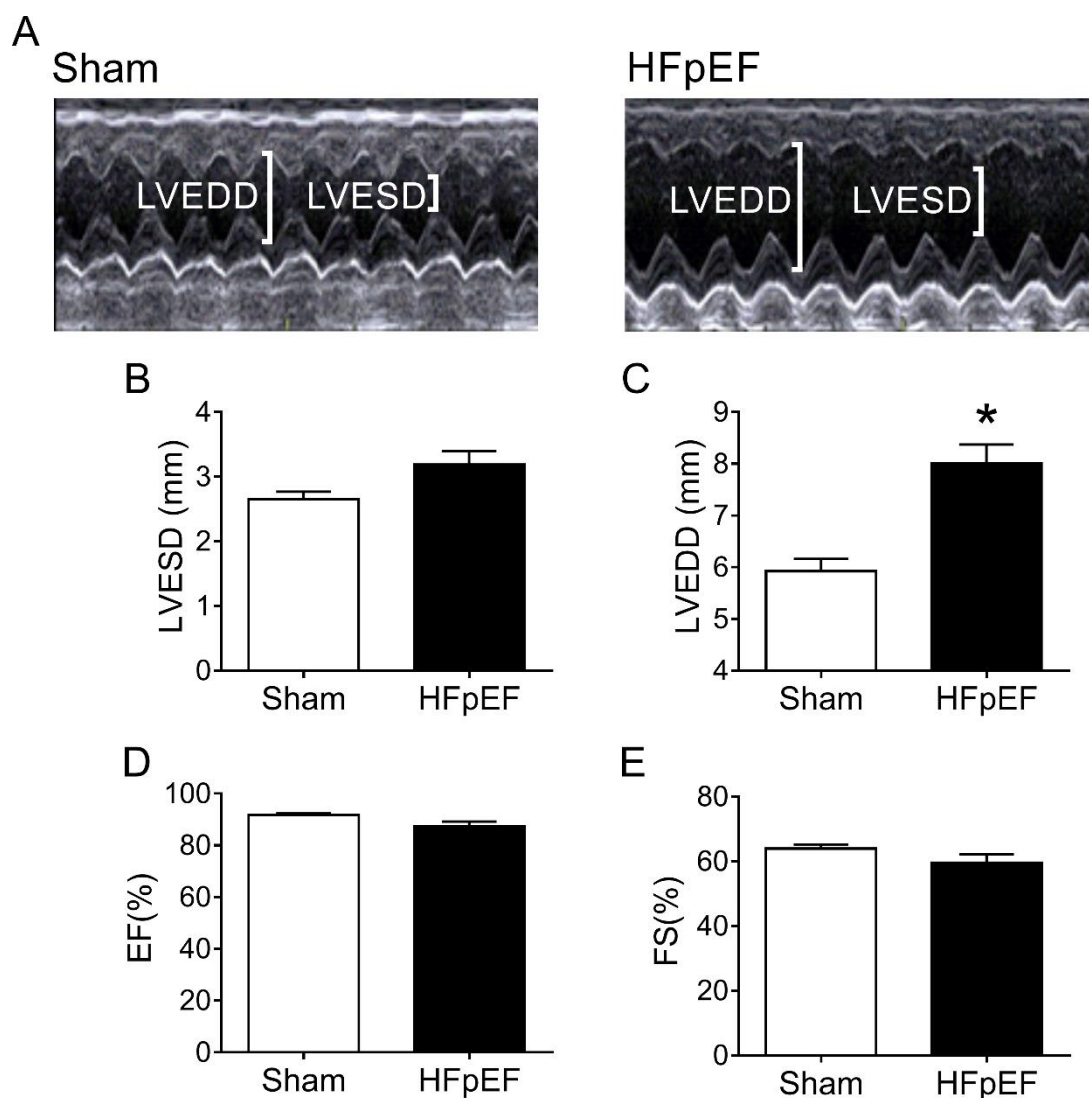


Figura 2. Los animales con HFpEF presentan dilatación del ventrículo izquierdo sin cambios en la fracción de eyección ni en la fracción de acortamiento. (A) imagen representativa de una ecocardiografía en modo-M del ventrículo izquierdo. Se puede observar que los animales HFpEF muestran un aumento en el tamaño de la cámara al fin de la sístole y al fin de la diástole. (B, C) Cuantificación del LVESD y del LVEDD en la condición HFpEF y Sham. (D, E) Cuantificación de la EF y de la FS en HFpEF vs. Sham. Prueba T de Student no pareada. *, $p < 0.05$ vs. Sham, $n = 8$ por grupo.

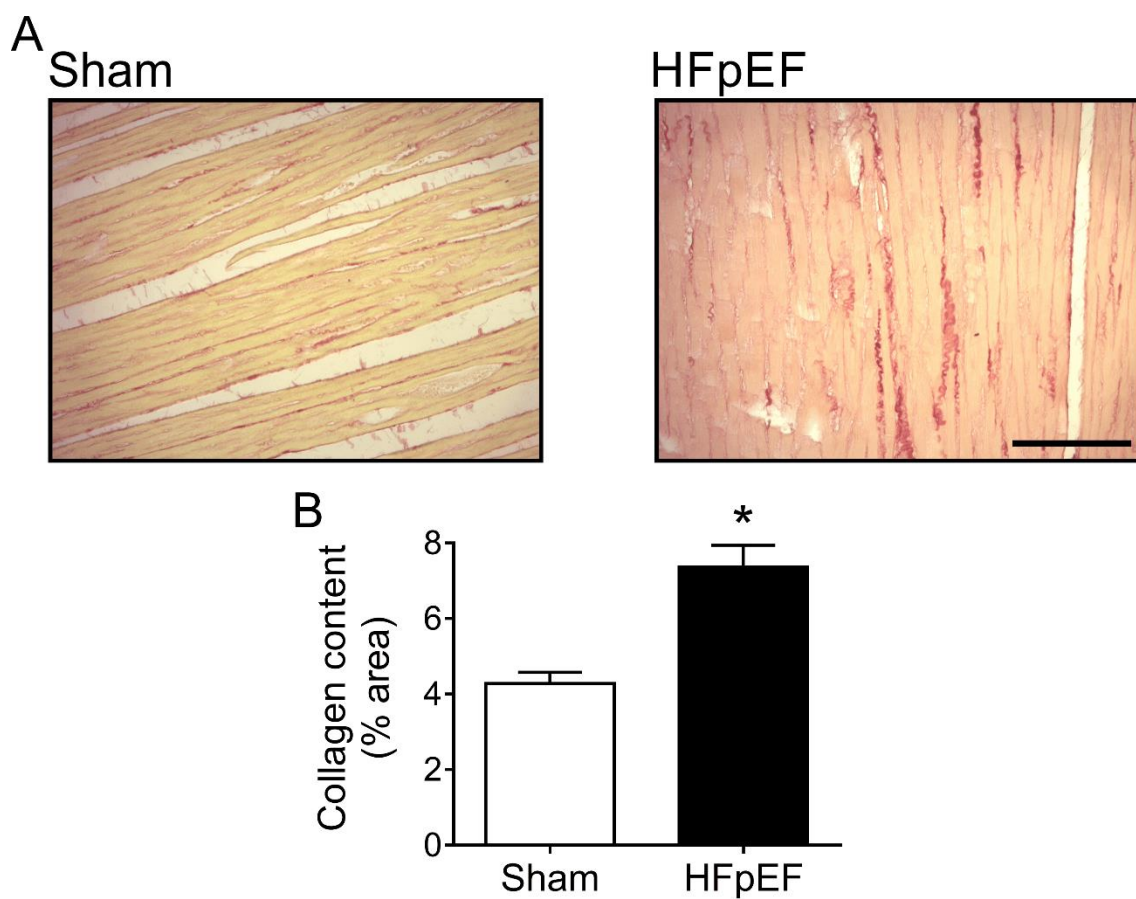


Figura 3. Las ratas con HFpEF presentan remodelamiento cardíaco. (A) imagen representativa del LV después de la tinción de picro-sirius rojo. Se puede observar que los animales HFpEF muestran un aumento en los depósitos de colágeno en el LV. La barra equivale a 80 μ m. (B) Cuantificación de las deposiciones de colágeno en el ventrículo izquierdo. Prueba T de Student no pareada. *, $p < 0.05$ vs. Sham, $n = 8$ por grupo.

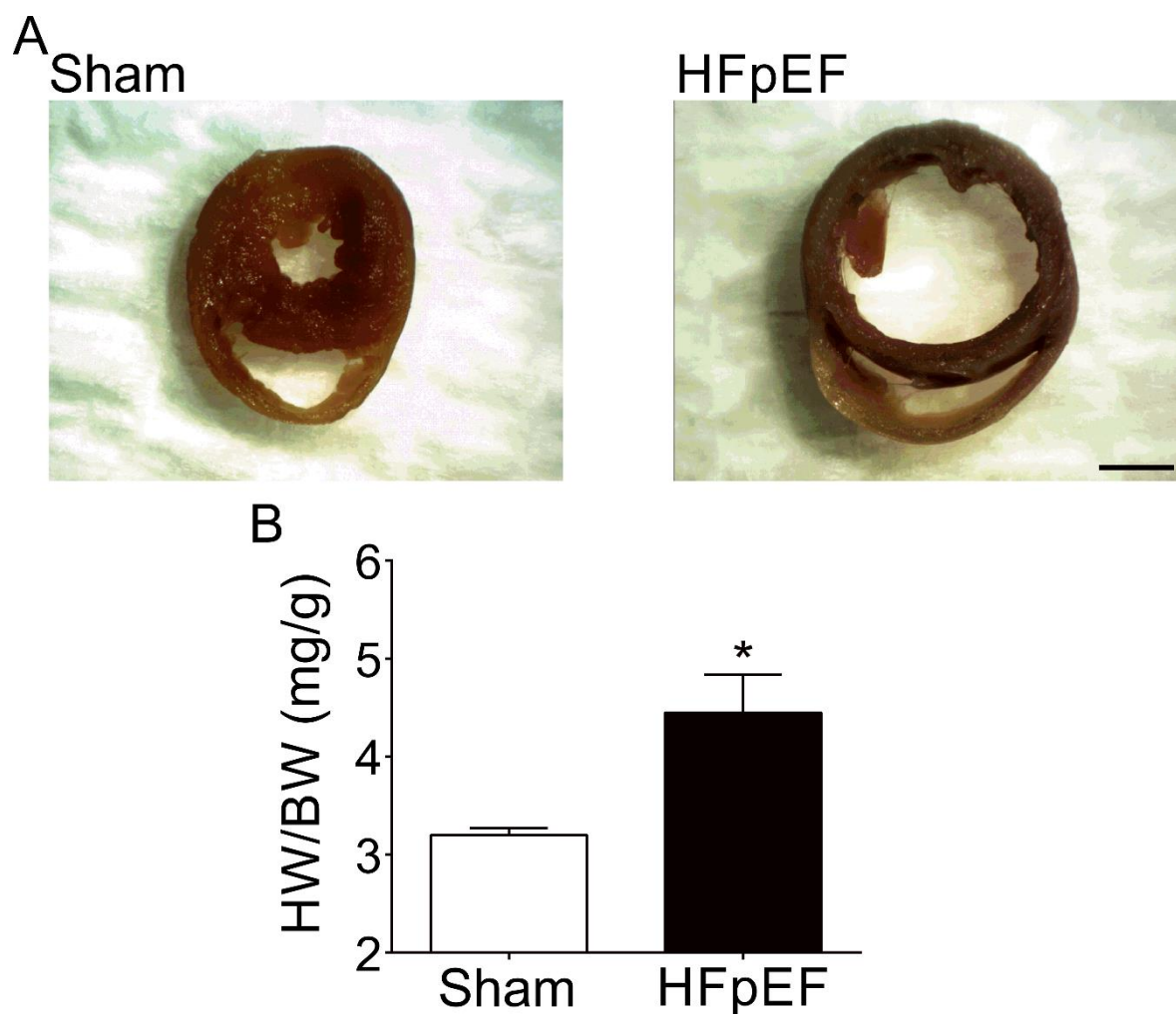


Figura 4. Las ratas con HFpEF presentan hipertrofia cardíaca. (A) Imagen representativa transversal del corazón de un animal Sham y un animal HFpEF. Los animales con HFpEF, muestran un aumento evidente en el tamaño del corazón. La barra equivale a 3 mm. (B) Cuantificación de la hipertrofia cardíaca medido por la razón del peso del corazón respecto del peso corporal (HW/BW). Prueba T de Student no pareada. *, $p < 0.05$ vs. Sham, $n = 8$ por grupo.

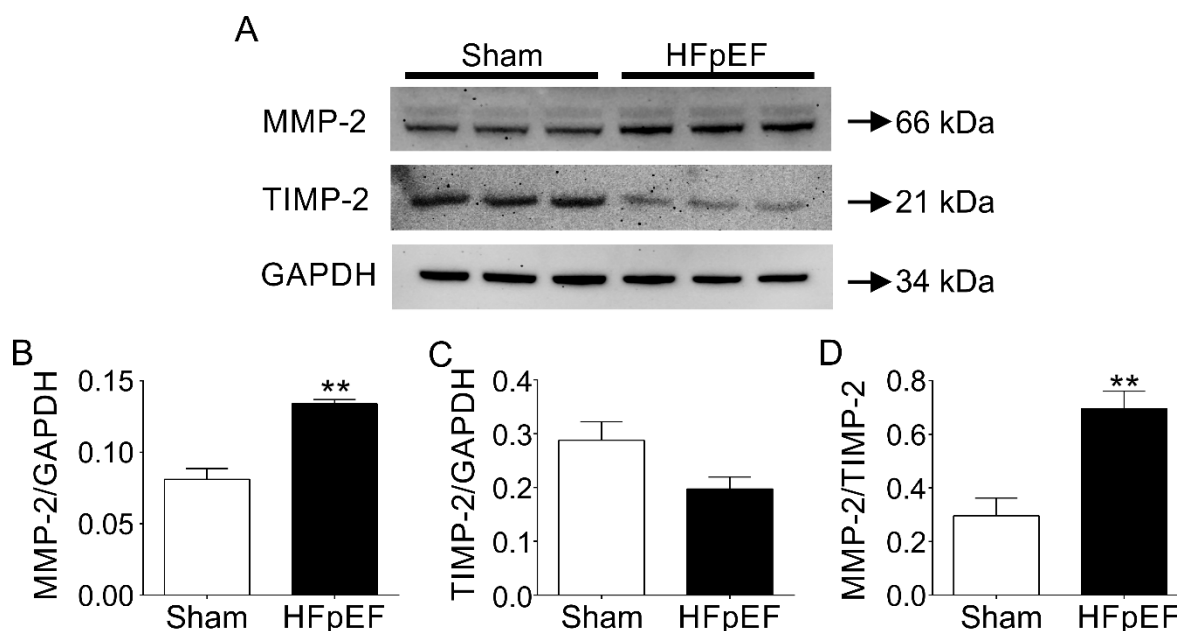


Figura 5. Las ratas con HFpEF muestran alteraciones en los niveles de la metaloproteinasa 2 y el inhibidor tisular de la metaloproteinasa 2. (A) Nivel de la metaloproteasa 2 (MMP-2) y el inhibidor tisular de la metaloproteasa 2 (TIMP-2) en el ventrículo izquierdo de tres animales Sham y 3 animales con HFpEF. Los animales con HFpEF muestran un descenso de TIMP-2 y un incremento de la MMP-2. (B) Cuantificación de la expresión de MMP-2 del LV de animales Sham y HFpEF. (C) Cuantificación de la expresión de TIMP-2 del LV de ratas Sham y HFpEF. (D) Cuantificación de la razón entre MMP-2/TIMP-2, como indicador de balance entre síntesis y degradación de la matriz extracelular de colágeno en el LV. Prueba T de Student no pareada. **, $p < 0.01$ vs. Sham, $n=8$ por grupo.

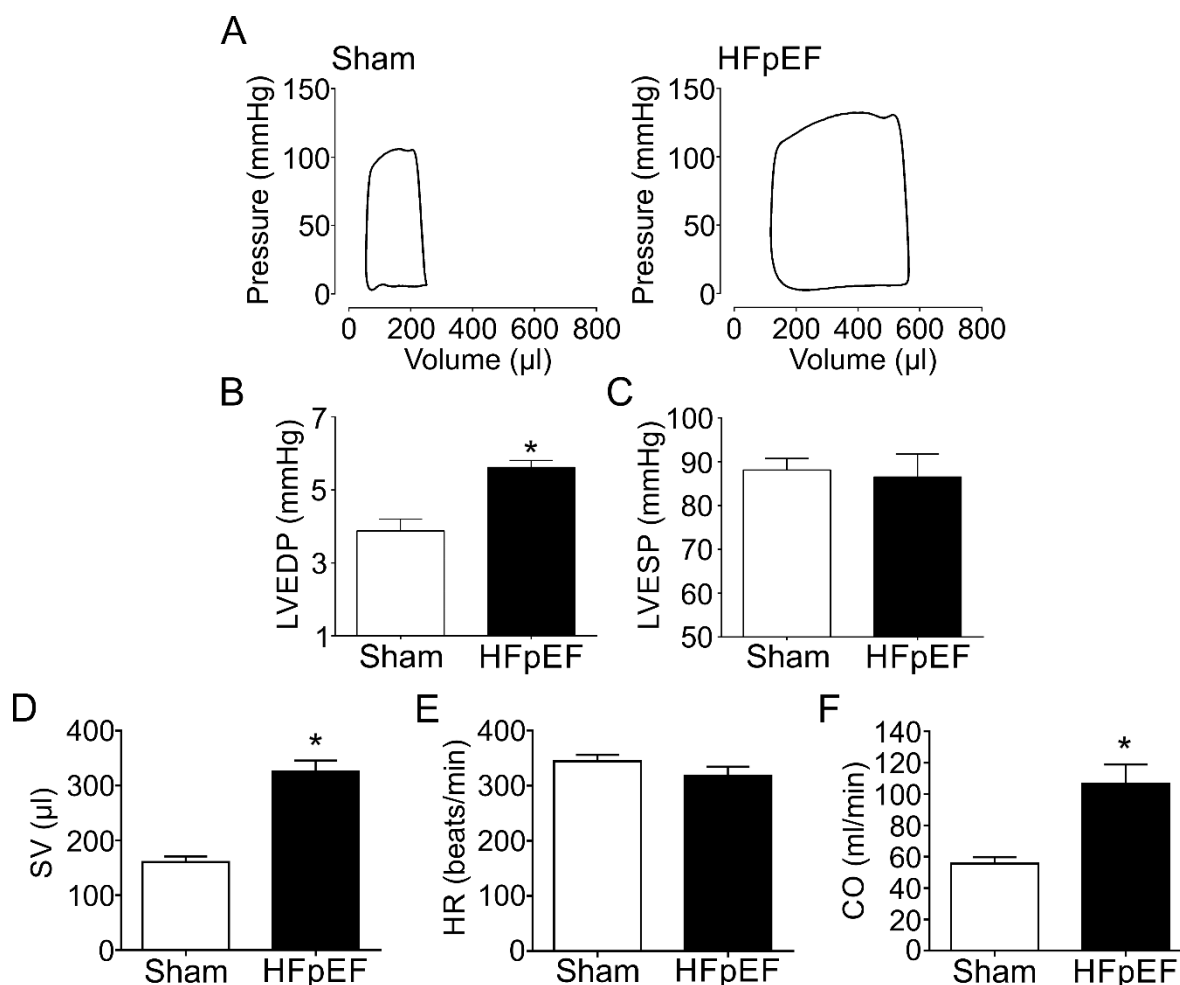


Figura 6. Ratas con HFpEF muestran dilatación del ventrículo izquierdo y aumento en la presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo (LVEDP). (A) Imagen representativa de un loop presión-volumen intraventricular de un animal Sham y un animal con HFpEF. Los animales HFpEF presentan un aumento en la cavidad del ventrículo izquierdo, evidenciado por un aumento del volumen eyectado (SV). (B) Cuantificación del LVEDP, donde se observa que los animales con HFpEF presentan un aumento del LVEDP en comparación con animales Sham. (C) Cuantificación de la presión de fin de sístole del ventrículo izquierdo (LVESP). (D) Cuantificación del SV, donde es posible observar un aumento del SV por parte de los animales HFpEF en comparación a los animales Sham. (E) Resumen de datos de la cuantificación de la frecuencia cardíaca (HR). (F) Cuantificación del gasto cardíaco (CO), donde se observa que hay un aumento del CO por parte de los animales HFpEF en comparación a los animales Sham. Prueba T de Student no pareada. *, $p < 0.05$ vs. Sham, $n = 8$ por grupo.

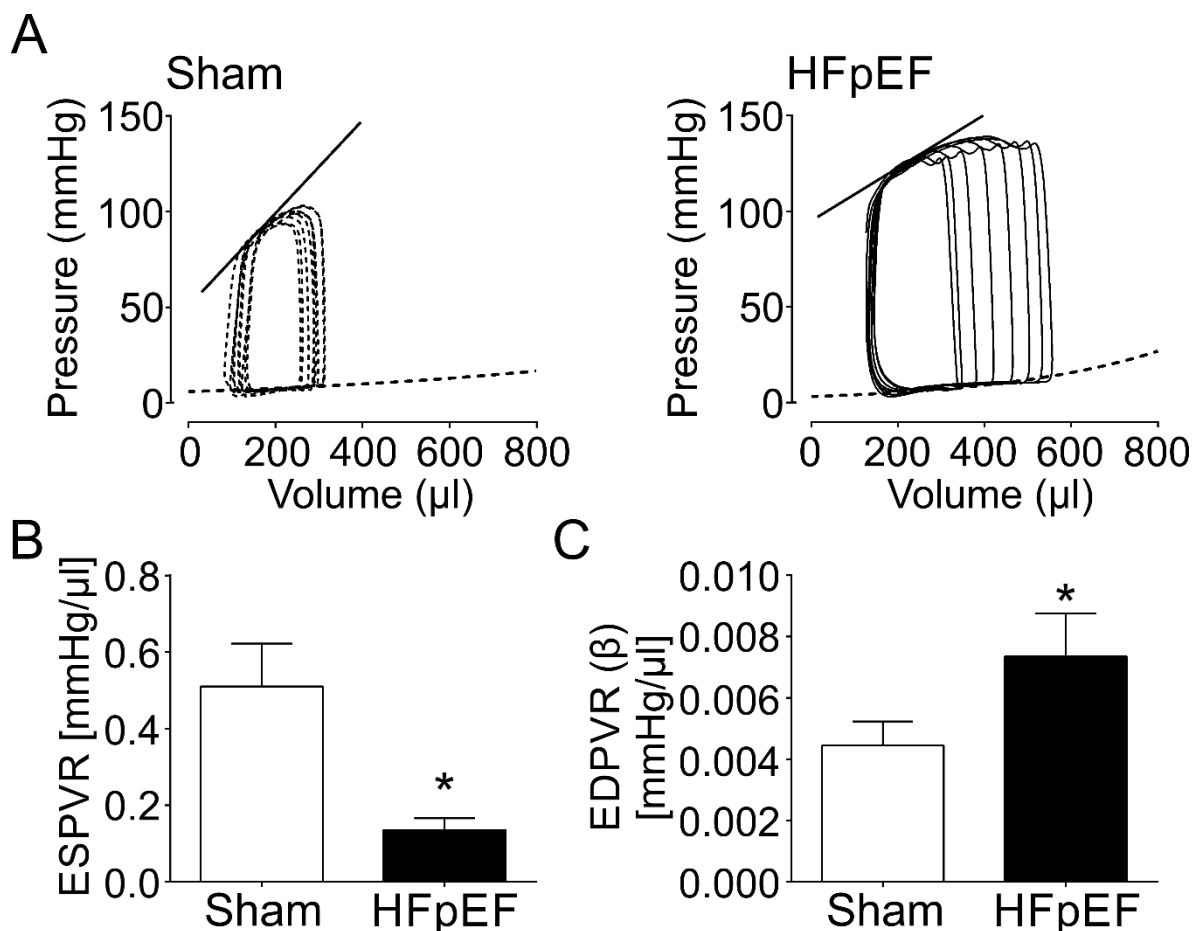


Figura 7. Las ratas con HFpEF presentan un deterioro de la función cardíaca sistólica y diastólica. (A) Imagen representativa de loops presión-volumen intraventricular durante la oclusión de la vena cava inferior en un animal Sham y en un animal HFpEF. Los animales HFpEF presentan una disminución en la relación presión-volumen de fin de sístole (ESPVR) y un aumento en la relación presión-volumen de fin de diástole (EDPVR). (B) Cuantificación del ESPVR como indicador de la función sistólica. (C) Cuantificación del EDPVR, como indicador de la función cardíaca diastólica. Prueba T de Student no pareada. *, $p < 0.05$ vs. Sham, $n = 8$ por grupo.

8.2.- La zona rostral-ventral-lateral de la médula (RVLM) de los animales con HFpEF está crónicamente activa y presenta un mayor nivel de estrés oxidativo.

La activación neuronal en el RVLM fue evaluada a través de la expresión del marcador de actividad crónica neuronal Fos-b. Los animales con HFpEF mostraron un incremento en la expresión relativa de Fos-b en comparación con los animales Sham (252.0 ± 56.5 vs. 100.0 ± 3.9 %, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 8B). Por medio de la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE), sensible a superóxido y parcialmente a peróxido de hidrogeno, se observó que los animales con HFpEF presentan un incremento en el nivel de estrés oxidativo en el RVLM en comparación a los animales Sham (12.3 ± 1.6 vs. 3.7 ± 0.6 AU, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 8A y C). Estos resultados sugieren que en HFpEF existe un incremento en la activación neuronal, lo cual estaría asociado con un incremento en la formación de ROS en la RVLM.

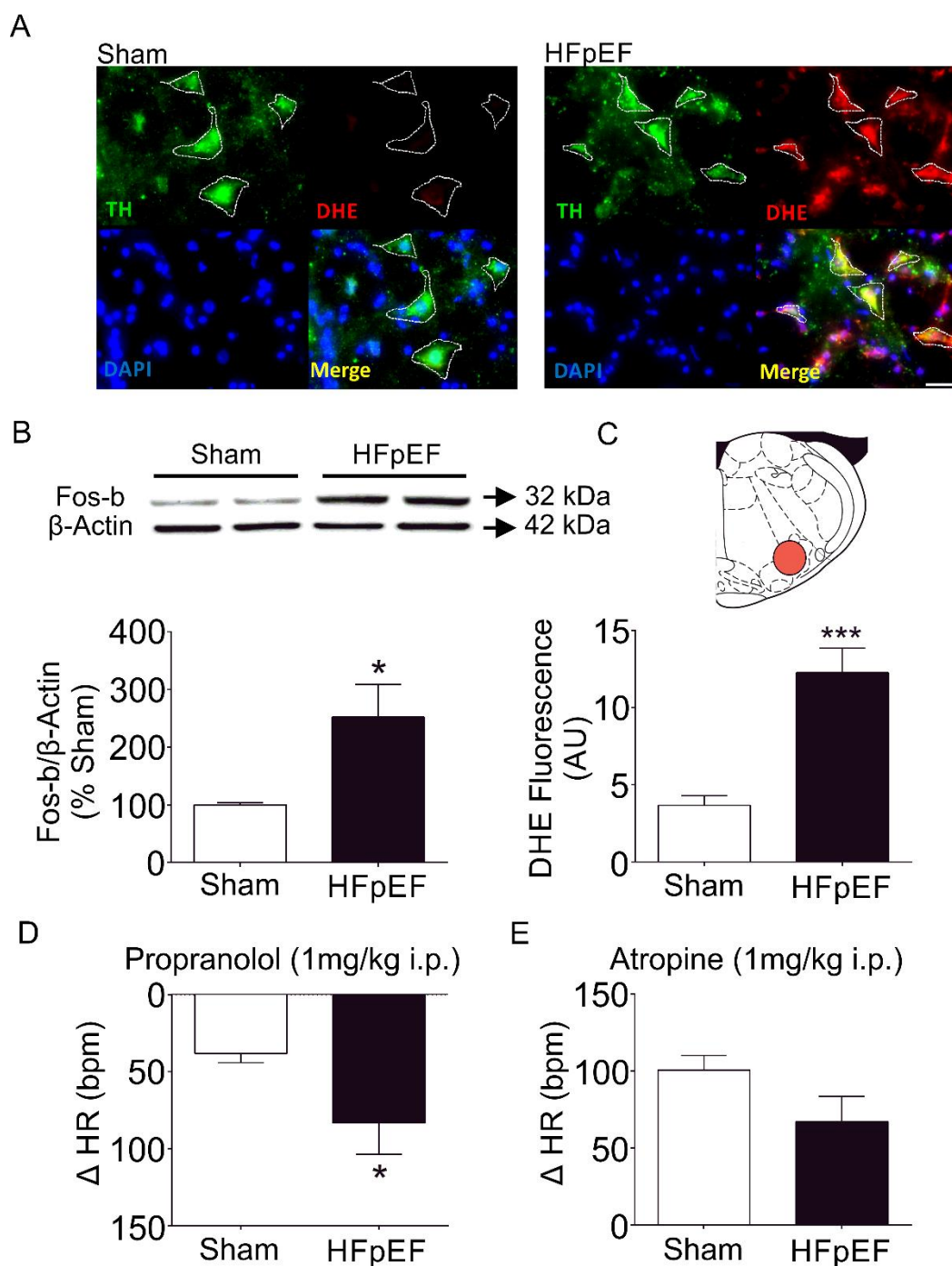


Figura 8. Ratas con HFpEF presentan un aumento de estrés oxidativo, activación crónica de la RVLM y desbalance simpático-vagal. (A) Las neuronas tirosina hidroxilasa positivas (TH+) de la RVLM muestran un aumento en la fluorescencia para dihidroetidio (DHE) comparado a los animales Sham. La barra equivale a 100 μ m. (B) Expresión de Fos-b en la RVLM. Los animales con HFpEF presentan un aumento en la expresión de Fos-b en la

RVLM en comparación a los animales Sham. (C) Cuantificación de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la RVLM. (D) La respuesta bradicardia a propranolol fue mayor en los animales HFpEF vs. Sham, sugiriendo mayor simpatoexcitación. (E) La respuesta taquicardia a atropina fue menor en los animales HFpEF vs. Sham, sugiriendo disminución del componente parasimpático. Prueba T de Student no pareada. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ vs. Sham, $n=6$ por grupo.

8.3.- Los animales con HFpEF muestran desbalance autonómico, sobre activación del quimiorreflejo central a CO₂, y barorreflejo cardíaco disminuido.

8.3.1. *Desbalance autonómico*: El control autonómico cardíaco fue determinado por medio de la administración de propanolol (1 mg/kg i.v.) y atropina (1 mg/kg i.v.), para cuantificar los cambios en la frecuencia cardíaca relacionados al bloqueo de receptores adrenérgicos y colinérgicos, respectivamente. Adicionalmente, se utilizó el análisis de la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV) en el dominio de la frecuencia como indicador indirecto de desbalance autonómico cardíaco. En comparación al grupo de animales Sham, las ratas con HFpEF mostraron una respuesta crono trópica a propanolol significativamente incrementada (-53.7 ± 5.4 vs. -21.4 ± 2.2 Δ HR, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 8D) y una respuesta crono trópica a atropina disminuida (33.5 ± 6.5 vs. 96.2 ± 9.9 Δ HR, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 8E). El análisis de HRV mostró que los animales con HFpEF presentan un incremento significativo de la potencia espectral del componente de baja frecuencia, asociado mayoritariamente al tono simpático (LF_{HRV} : 0.04 – 0.6 Hz; 48.07 ± 6.14 vs. 17.80 ± 3.42 n.u., $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 9A y B) y una disminución en el componente de alta frecuencia (HF_{HRV} : 0.6 – 2.4 Hz; 47.46 ± 6.27 vs. 74.38 ± 2.86 n.u., $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 9A y C), asociado mayoritariamente al con el tono parasimpático. Además, se observó que la razón LF/HF del HRV, como indicador del balance simpático-vagal, está aumentada en los animales HFpEF

en comparación a los animales Sham (0.95 ± 0.13 vs. 0.25 ± 0.05 , $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 9A y C). Estos resultados muestran que los animales con HFpEF presentan un desbalance autonómico, caracterizado tanto por un incremento del simpático como también de una disminución del control vagal cardíaco.

8.3.2. Quimiorreflejo: Los animales con HFpEF mostraron una disminución en la respuesta ventilatoria a hipoxia (HVR) en comparación a los animales Sham (2.1 ± 0.4 vs. 6.1 ± 0.8 $\%/\Delta V_E$, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente, Figura 10A, B y C). Por otro lado, se observó que los animales con HFpEF presentaron un incremento significativo de la respuesta ventilatoria a hipercapnia (HCVR) en comparación a los animales Sham (19.1 ± 1.3 vs. 13.9 ± 0.9 $\Delta V_E/\%$, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, Figura 10 A, D y E). Estos resultados muestran que en HFpEF los quimiorreflejos centrales que responden a CO_2 presentan un aumento de ganancia, mientras que los quimiorreflejos periféricos que responden a la hipoxia no presentan un aumento en su actividad.

8.3.3. Barorreflejo: Se ha propuesto que existe interacción entre el quimiorreflejo ventilatorio y el control barorreflejo cardíaco. En HFpEF el quimiorreflejo central hipercápnico esta incrementado y el control quimiorreflejo periférico hipóxico está disminuido, por lo tanto, me propuse determinar si la sensibilidad del barorreflejo (BRS) estaría alterado en las ratas HFpEF. Los animales con HFpEF muestran una ganancia del BRS disminuida en comparación a los animales Sham (Secuencias DOWN: 1.34 ± 0.39 vs. 4.91 ± 0.41

mmHg/ms, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente; Secuencias UP: 1.41 ± 0.42 vs. 14.26 ± 2.90 mmHg/ms, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente; Secuencias Total: 1.23 ± 0.25 vs. 8.63 ± 1.42 mmHg/ms, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente) (Figura 11). Los animales con HFpEF mostraron una disminución significativa de la efectividad del BRS en comparación a las ratas Sham (0.021 ± 0.001 vs. 0.087 ± 0.015 mmHg/ms, $p < 0.05$, HFpEF vs. Sham, respectivamente (Figura 11E)).

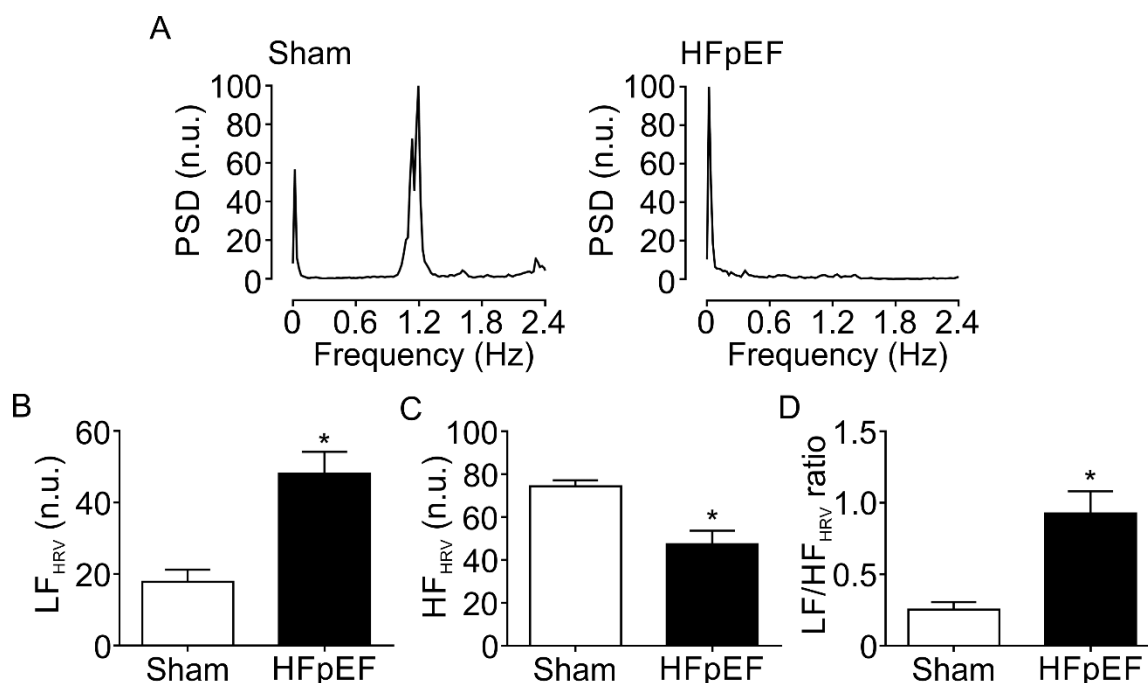


Figura 9. Las ratas con HFpEF presentan alteraciones en la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV). (A) Espectros representativos de la HRV. Las ratas HFpEF presentan un aumento en el componente de baja frecuencia (LF_{HRV} : 0.04-0.6 Hz) y una disminución del componente de alta frecuencia (HF_{HRV} : 0.6-2.4 Hz) en comparación a las ratas Sham. La potencia espectral es mostrada como unidades normalizadas (n.u.) (B, C, D) Cuantificación del LF (B), HF (C) y la razón LF/HF (D) como indicador de balance autonómico. Los animales presentan un aumento del componente simpático cardíaco (LF_{HRV}) (B), una disminución del componente parasimpático (HF_{HRV}) (C) en comparación a los animales Sham. Consecuentemente los animales HFpEF muestran un deterioro del desbalance simpático-vagal en comparación a los animales Sham. Prueba T de Student no pareada. *, $p < 0.05$ vs. Sham, $n=6$ por grupo.

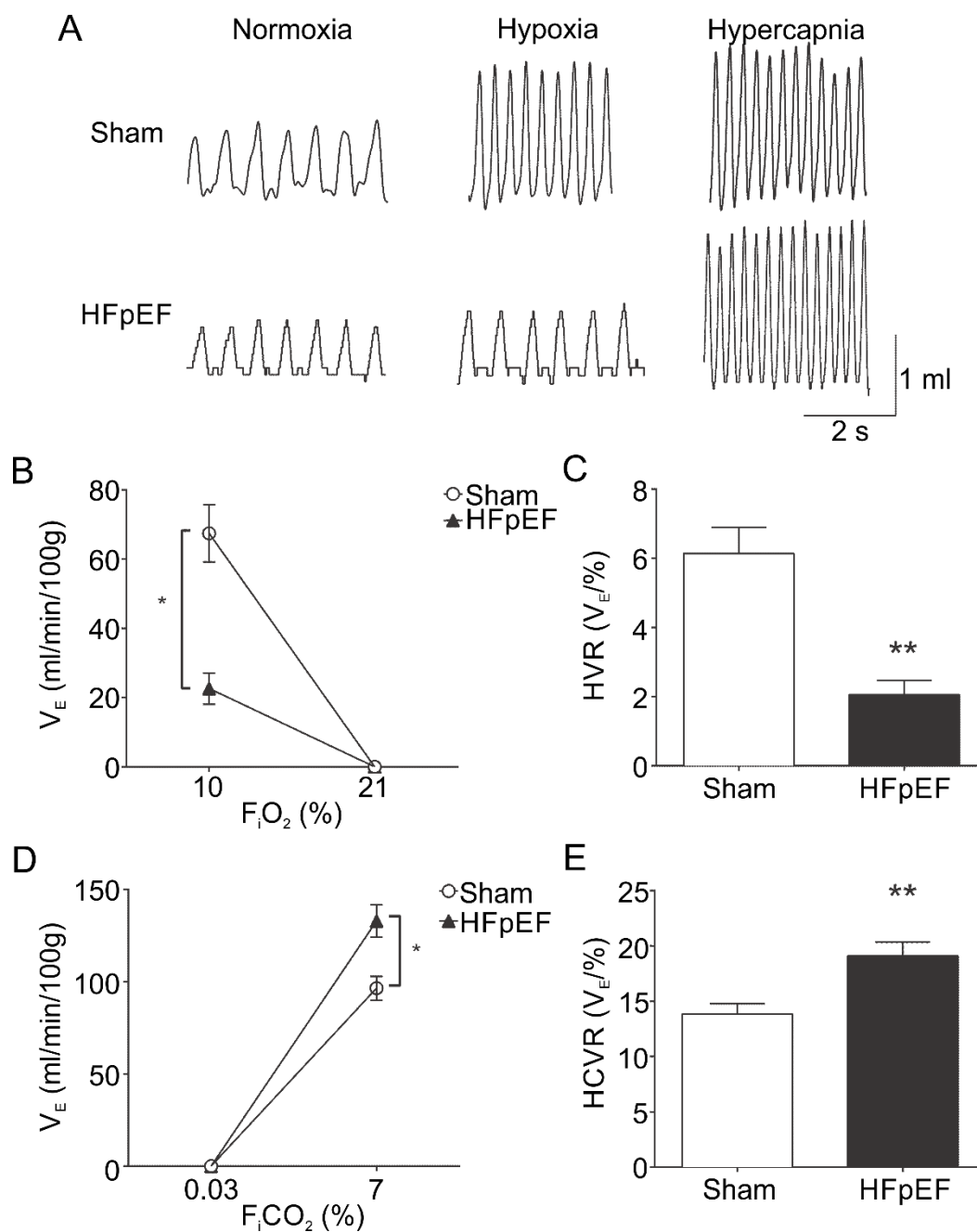


Figura 10. La respuesta ventilatoria a la hipercapnia (HCVR) y no la respuesta ventilatoria a la hipoxia (HVR) están aumentada en ratas con HFpEF. (A) Registros representativos del volumen corriente (V_t) en normoxia (F_{iO_2} 21%), hipoxia (F_{iO_2} 10%) e hipercapnia (F_{iCO_2} 7%) en un animal Sham y un animal HFpEF. (B, C) La magnitud de la ganancia de la respuesta ventilatoria a la hipoxia (HVR) esta disminuida en los animales HFpEF vs Sham. (E, F) La ganancia de la respuesta ventilatoria a la hipercapnia (HCVR)

esta potenciada en los animales HFpEF vs. Sham. Prueba T de Student no pareada. **, $p < 0.01$ vs. Sham, $n=6$ por grupo.

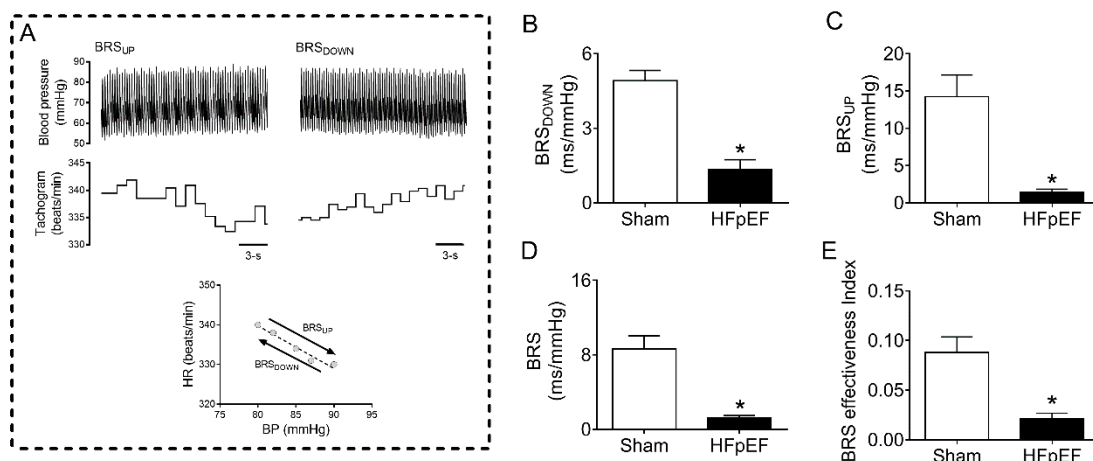


Figura 11. Las ratas con HFpEF presentan una disminución en la sensibilidad del barorreflejo cardíaco. (A) Registros representativos de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca de secuencias BRS positivas. Ejemplo de la cuantificación de secuencias BRS_{UP} y BRS_{DOWN}. (B, C) La magnitud de la ganancia del BRS_{DOWN} y BRS_{UP} está disminuidas en las ratas HFpEF en comparación a las ratas Sham. (D, E) La ganancia total del BRS (D) y la efectividad del BRS (E) están disminuidas en los animales HFpEF en comparación a las ratas Sham. Prueba T de Student no pareada. *, $p < 0.05$ vs. Sham, $n = 6$ por grupo.

8.4.- La activación aguda del quimiorreflejo central con hipercapnia empeora el balance autonómico, la función cardíaca y la arritmogénesis cardíaca en animales con HFpEF.

Para poder determinar las consecuencias de la activación aguda del quimiorreflejo central sobre el balance autonómico cardíaco, se estudió la función autonómica mediante el análisis de HRV durante la estimulación con hipercapnia ($F_i\text{CO}_2$ 7%). Durante la hipercapnia, los animales con HFpEF mostraron un mayor incremento del componente LF_{HRV} (212.5 ± 15.1 vs. $179.8 \pm 13.1\%$, $p < 0.05$, HFpEF+Hypercapnia vs. HFpEF+Normoxia, respectivamente, Figura 12A, B), sin mayor cambio en el componente HF_{HRV} en comparación a su condición en normoxia ($F_i\text{O}_2$ 21%) (Figura 12C). Consecuentemente, se observó que los animales con HFpEF mostraron un aumento mayor de la razón LF/HF del HRV comparado a su condición de normoxia (296.0 ± 21.9 vs. $229.6 \pm 21.6\%$, $p < 0.05$, HFpEF+Hypercapnia vs. HFpEF+Normoxia, respectivamente, Figura 12A, D). En conjunto estos resultados sugieren que la estimulación de los quimiorreceptores centrales con hipercapnia desencadena un deterioro aun mayor del control autonómico cardíaco, caracterizado principalmente por un aumento del componente simpático (LF_{HRV}) del HRV en los animales con HFpEF.

La función cardíaca fue determinada durante la estimulación con hipercapnia ($F_i\text{CO}_2$ 7%). En condiciones de normoxia, los animales con HFpEF en comparación a las ratas Sham, presentan una disminución de la pendiente del ESPVR, como indicador del deterioro de la función cardíaca sistólica (ESPVR: 0.13 ± 0.03 vs. 0.51 ± 0.11 mmHg/ul, $p < 0.05$,

HFpEF+Normoxia vs. Sham+Normoxia, respectivamente, Figura 13A, B) como también un aumento del coeficiente exponencial del ajuste de EDPVR (β), como indicador del deterioro de la función cardíaca diastólica (EDPVR: 0.008 ± 0.001 vs. 0.004 ± 0.001 mmHg/ul, $p < 0.05$, HFpEF+Normoxia vs. Sham+Normoxia, respectivamente, Figura 13A, C). Por otro lado, durante la estimulación con hipercapnia los animales del grupo Sham no mostraron cambios significativos en la contractibilidad como tampoco en las propiedades pasivas del ventrículo izquierdo (Figura 13A, B, C). No obstante, los animales con HFpEF mostraron un deterioro mayor de la función cardíaca diastólica durante la estimulación con hipercapnia (0.020 ± 0.010 vs. 0.007 ± 0.001 mmHg/ul, $p < 0.05$, HFpEF+Hypercapnia vs. HFpEF+Normoxia respectivamente, Figura 13A, B, C), sin cambios en la función cardíaca sistólica (Figura 13A, B, C). No se observaron cambios en las variables cardiovasculares basales durante la estimulación con hipercapnia (Tablas 1 y 2).

Se ha demostrado que una de las principales características de la HF es la incidencia de arritmias cardíacas. En condiciones de normoxia, comparado a los animales del grupo Sham, los animales HFpEF mostraron un incremento significativo en la incidencia de arritmias cardíacas (196.0 ± 84.8 vs. 19.8 ± 7.2 eventos/hora, $p < 0.05$ HFpEF+Normoxia vs. Sham+Normoxia, respectivamente, Figura 14A, B). Durante la estimulación con hipercapnia, los animales con HFpEF mostraron un incremento en la incidencia de arritmias en comparación a su condición de normoxia (576.7 ± 273.0 vs. 196.0 ± 84.8 eventos/hora,

$p < 0.05$, HFpEF+Hypercapnia vs. HFpEF+Normoxia, respectivamente, Figura 14A, B).

Estos resultados sugieren que la estimulación de los quimiorreceptores centrales con hipercapnia incrementaría el control simpático, produciendo un deterioro mayor de la función cardíaca diastólica y un aumento en la incidencia de arritmias en animales con HFpEF. Para determinar si el aumento de las arritmias cardíacas depende del aumento simpático hacia el corazón, durante la estimulación con hipercapnia se administró propranolol (1mg/kg i.v.). En la Figura 14 se puede observar que el incremento de la arritmogénesis cardíaca durante la estimulación con hipercapnia fueron completamente suprimidas por la administración de propranolol.

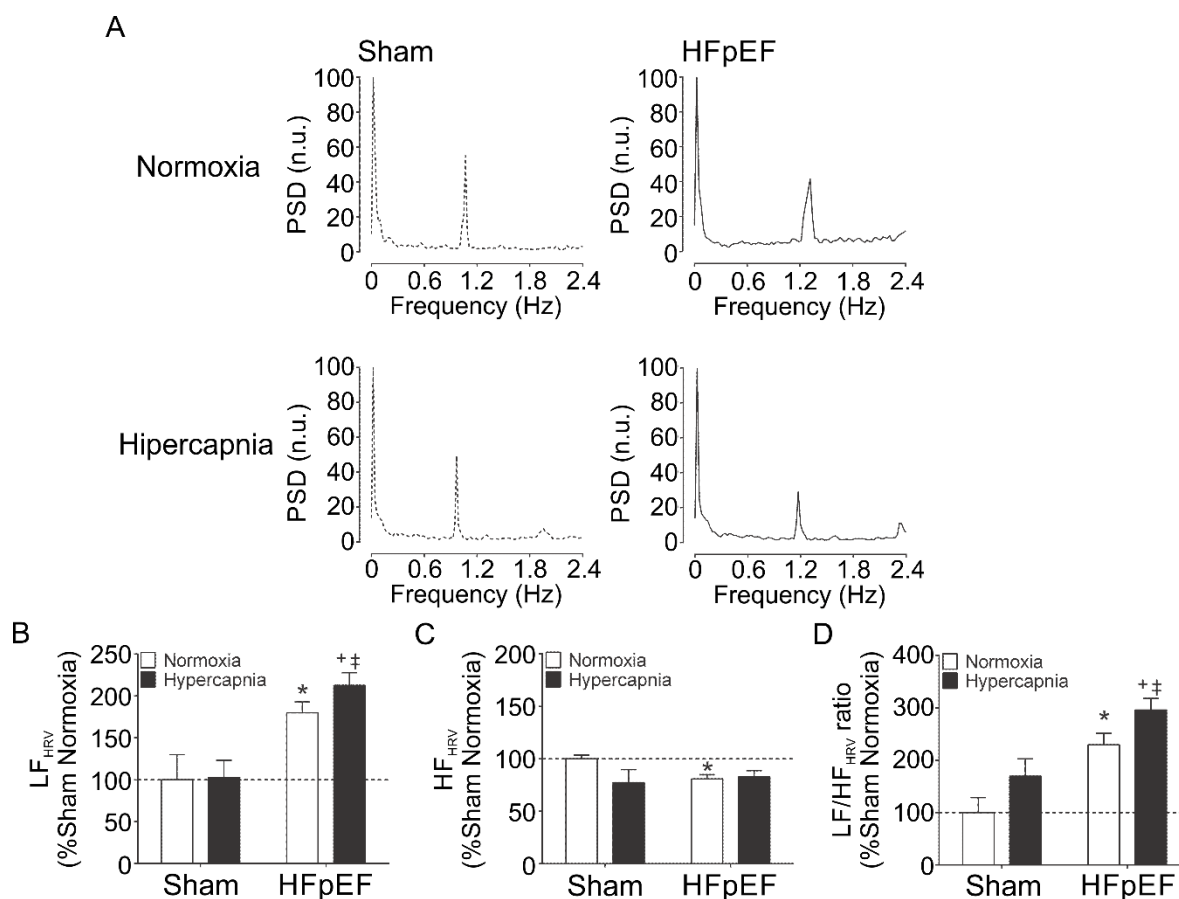


Figura 12. La activación aguda de los quimiorreceptores centrales con hipercapnia empeora el control autónomo cardíaco en ratas con HFpEF. (A) Espectros representativos de la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV). Las ratas HFpEF, presentan un aumento en el componente de baja frecuencia (LF_{HRV}: 0.04-0.6 Hz) y una disminución del componente de alta frecuencia (HF_{HRV}: 0.6-2.4 Hz) en normoxia (F_iO₂ 21%) vs las ratas Sham, lo cual se exagera durante la estimulación con hipercapnia (F_iCO₂ 7%). (B, C, D) Cuantificación del LF_{HRV} (B), HF_{HRV} (C) y la razón LF/HF_{HRV} (D) como indicador de balance autónomo. (B) En las ratas HFpEF, el LF_{HRV}, mayoritariamente asociado al control simpático, aumenta durante la estimulación con hipercapnia en comparación a su condición de normoxia. (C) El componente HF_{HRV}, asociado mayoritariamente al control parasimpático, se cambia significativamente después de la estimulación con hipercapnia en las ratas HFpEF. (D) La razón LF/HF_{HRV}, como indicador del balance simpático/vagal, incrementa aún más en las ratas HFpEF, en comparación a su condición control. ANOVA de

dos factores, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Normoxia; +, $p < 0.05$ vs. Sham+Hiper-capnia; ‡, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Normoxia, n=4 por grupo.

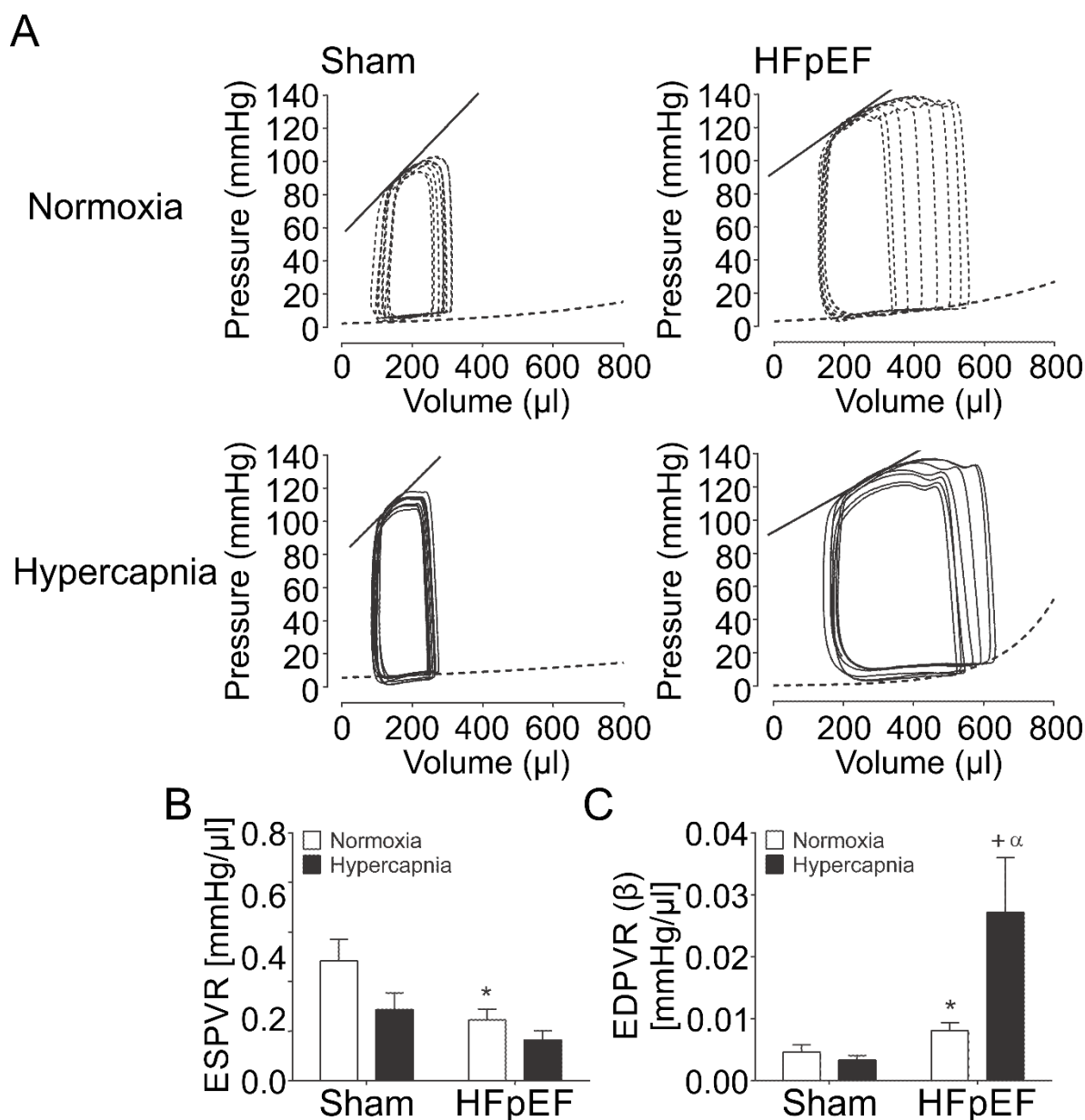


Figura 13. El deterioro de la función cardíaca diastólica empeora durante la estimulación con hipercapnia en las ratas con HFpEF. (A) Imagen representativa de un loop presión-volumen intraventricular durante la disminución de la precarga por la oclusión de la vena cava durante normoxia (F_iO_2 21%) e hipercapnia (F_iCO_2 7%) en un animal Sham y HFpEF. Los animales HFpEF presentan una disminución en la relación presión-volumen de fin de sístole (ESPVR, línea continua) y un aumento en la relación presión-volumen de fin de diástole (EDPVR, línea segmentada) en normoxia. Durante la estimulación con hipercapnia la función cardíaca diastólica (EDPVR) fue deteriorada aún más, en comparación a su

condición de normoxia. Los animales Sham no mostraron modificaciones significativas sobre el ESPVR y el EDPVR durante la estimulación con hipercapnia. (B) Cuantificación del ESPVR como indicador de la función sistólica. Los animales HFpEF muestran un deterioro del ESPVR en condiciones de normoxia, comparado a los animales Sham. Durante la estimulación con hipercapnia los animales HFpEF no muestran alteraciones significativas en comparación a su condición de normoxia. (C) Cuantificación del EDPVR, como indicador de la función cardíaca diastólica. Los animales HFpEF muestran un deterioro del EDPVR en la condición de normoxia en comparación a los animales Sham. Durante la estimulación con hipercapnia los animales HFpEF muestran un deterioro mayor de la función cardíaca diastólica en comparación a su condición de normoxia. ANOVA de dos factores, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Normoxia; +, $p < 0.05$ vs. Sham+Hipercapnia; α , $p < 0.05$ vs. HFpEF+Normoxia, $n=10$ por grupo.

Tabla 1. Efecto de la hipercapnia sobre parámetros hemodinámicos basales de PV-loop.

	Sham+Normoxia (n = 10)	Sham+Hipercapnia (n = 10)	HFpEF+Normoxia (n = 10)	HFpEF+Hipercapnia (n = 10)
Función cardíaca global				
HR, beats/min	344.2 ± 11.9	353.6 ± 14.6	318.3 ± 16.15	314.1 ± 10.8
CO, ml/min	55.5 ± 4,2	52.4 ± 5,6	106.6 ± 12.4*	83.2 ± 11.1*
LVEDP, mmHg	3.8 ± 0.3	5.0 ± 0.7	5.6 ± 0.1*	5.7 ± 0.4*
Pre-carga y post-carga				
LVEDV, µl	245.1 ± 14.8	263.0 ± 7.2	460.1 ± 24.0*	465.1 ± 15.3*
Ea, mmHg/µl	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.2 ± 0.0* ⁺	0.4 ± 0.1 ⁺
Función sistólica del LV				
LVEF, %	72.1 ± 2.3	82.2 ± 2.7	75.9 ± 3.4	73.8 ± 7.2
LVESV, µl	84.6 ± 7.6	81.2 ± 3.5	134.5 ± 12.9* ⁺	195.2 ± 8.7* ⁺
dp/dt _{max} , mmHg/s	8,260.0 ± 1,046.0	8,612.0 ± 967.1	8,057.0 ± 817.7	7942 ± 745.1
Función diastólica del LV				
<i>Relajación activa</i>				
Tau, ms	9.6 ± 0.9	11.1 ± 0.9	8.9 ± 0.5	10.8 ± 0.7
dp/dt _{min} , mmHg/s	-6,603.0 ± 372.8	-6,429 ± 522.9	-5,903.0 ± 646.6	-6,429 ± 552.9

Los valores están expresados como media ± error estándar de la media (S.E.M.). HR: Frecuencia cardíaca; CO: gasto cardíaco; LV: Ventrículo izquierdo; EDP: Presión de fin de diástole; EDV: Volumen de fin de diástole; Ea: elastancia; EF: fracción eyectada; ESV: Volumen de fin de sístole; Tau: Constante de relajación; ANOVA de dos vías, seguido del análisis Holm-Sidak. * vs. Sham+Normoxia, ⁺ vs. Sham+Hipercapnia, *P* < 0.01.

Tabla 2. Efecto de la hipercapnia sobre parámetros hemodinámicos basales de PV-loop.

	Sham+Normoxia (n = 10)	Sham+Hipoxia (n = 10)	HFpEF+Normoxia (n = 10)	HFpEF+Hipoxia (n = 10)
Función cardíaca global				
HR, beats/min	343.2 ± 10.9	343.2 ± 10.1	317.3 ± 14.16	341.0 ± 14.3
CO, ml/min	55.4 ± 4,6	56.8 ± 8.2	106.6 ± 12.4*	98.1 ± 12.4
LVEDP, mmHg	3.7 ± 0.3	4.8 ± 0.3	5.5 ± 0.1*	5.8 ± 0.3*
Pre-carga y post-carga				
LVEDV, µl	246.1 ± 13.8	230.2 ± 28.6	462.1 ± 24.2*	398.9 ± 36.0*
Ea, mmHg/µl	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.0* ⁺	0.3 ± 0.1* ⁺
Función sistólica del LV				
LVEF, %	73.1 ± 2.3	77.0 ± 4.1	77.9 ± 3.4	78.1 ± 3.0
LVESV, µl	85.6 ± 7.6	68.3 ± 12.1	136.5 ± 12.9* ⁺	130.7 ± 15.4* ⁺
dp/dt _{max} , mmHg/s	8,263.0 ± 1,047.0	7,652.8 ± 605.7	8,056.0 ± 818.7	10,804.8 ± 1,277.9
Función diastólica del LV				
<i>Relajación activa</i>				
Tau, ms	9.5 ± 0.9	13.4 ± 2.0*	8.8 ± 0.5	9.4 ± 0.6
dp/dt _{min} , mmHg/s	-6,633.0 ± 374.8	-5,292.3 ± 726.8	-5,901.0 ± 647.6	-6,247.7 ± 522.7

Los valores están expresados como media ± error estándar de la media (S.E.M.). HR: Frecuencia cardíaca; CO: gasto cardíaco; LV: Ventrículo izquierdo; EDP: Presión de fin de diástole; EDV: Volumen de fin de diástole; Ea: elastancia; EF: fracción eyectada; ESV: Volumen de fin de sístole; Tau: Constante de relajación; ANOVA de dos vías, seguido del análisis Holm-Sidak. * vs. Sham+Normoxia, ⁺ vs. Sham+Hipoxia, *P* < 0.01.

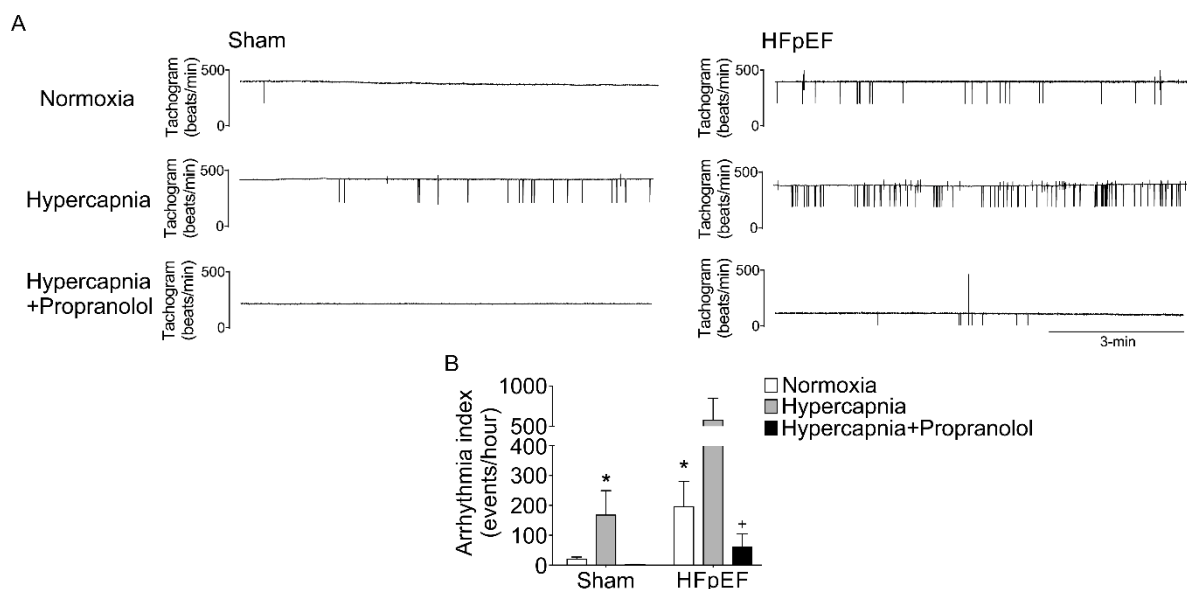


Figura 14. La activación de los quimiorreceptores centrales con hipercapnia incrementa la incidencia de arritmias cardíacas en animales Sham y HFpEF. (A) Registros representativos de la frecuencia cardíaca durante normoxia (F_{iO_2} 21%), hipercapnia (F_{iCO_2} 7%) e hipercapnia + propranolol (1mg/kg i.v.) en un animal Sham y HFpEF. (B) La incidencia de arritmias fue aumentada durante la estimulación con hipercapnia en las ratas Sham y con HFpEF. La administración de propranolol disminuye el efecto de la hipercapnia en los animales Sham y HFpEF (B) Cuantificación del número de eventos arrítmicos en condiciones de normoxia, hipercapnia e hipercapnia+propranolol. Se puede observar que la hipercapnia induce un aumento de eventos arrítmicos en las dos condiciones, lo cual es abolido por la administración de propranolol. ANOVA de dos factores, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Normoxia; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Hipercapnia, $n=6$ por grupo.

8.5.- La destrucción selectiva de la RVLM restablece el balance autonómico en animales con HFpEF.

Los resultados previos sugieren que el aumento de la hiperactividad simpática contribuiría de manera importante al deterioro de la HFpEF. Por lo tanto, nos propusimos eliminar selectivamente neuronas pre-simpáticas del RVLM. En la figura 15 se puede observar el procedimiento experimental. A la semana 0 se realizó las cirugías Sham y las HFpEF, luego de 4 semanas se evaluó el grado de deterioro cardíaco por medio de ecocardiografía, luego se inyectó bilateralmente la toxina saporina conjugada con D β H (D β H+SAP, 7.5 ng/150nl de NaCl 0.9%) o la inyección vehículo (Veh) y después de 4 semanas post-inyecciones se realizaron los experimentos fisiológicos (Figura 15). A la semana 8, los animales tratados con la toxina D β H+SAP mostraron una disminución significativa en el número de neuronas C1 de la RVLM comparado a los animales que fueron tratados con vehículo (Veh) (270.1 ± 27.0 y 264.0 ± 32.0 neuronas vs. 512.0 ± 42.0 and 533.0 ± 48.0 neuronas, $p < 0.05$, Sham+D β H-SAP y HFpEF+D β H-SAP vs. Sham+Veh y HFpEF+Veh, respectivamente, Figura 16 B y C). Luego se determinó si es que la eliminación selectiva de las neuronas C1 del RVLM tiene un efecto sobre el desbalance autonómico cardíaco en los animales HFpEF. El control autonómico fue determinado en animal despierto, a través de la respuesta cronotrópica cardíaca (Δ frecuencia cardíaca [Δ HR]) a propranolol (1 mg/kg i.p.) y atropina (1 mg/kg i.p.). Los animales con HFpEF mostraron un incremento del control simpático,

evidenciado por una mayor respuesta cronotrópica a propranolol, en comparación a los animales Sham (-96.0 ± 7.8 vs. -26.7 ± 3.9 Δ latidos/min, $p < 0.05$, HFpEF+Veh vs. Sham+Veh, respectivamente, Figure 16D). La eliminación selectiva de las neuronas C1 de la RVLM con la toxina D β H+SAP disminuye el control simpático en los animales con HFpEF en comparación a la inyección vehículo (-50.3 ± 7.3 vs. -96.0 ± 7.8 Δ latidos/min, $p < 0.05$, HFpEF+D β H-SAP vs. HFpEF+Veh, respectivamente, Figura 16D). No se observaron diferencias significativas en la respuesta cronotrópica a propranolol entre los animales Sham+Veh y Sham+D β H-SAP (-26.7 ± 3.9 vs. -29.7 ± 3.7 Δ latidos/min, Sham+Veh vs. Sham+D β H-SAP, respectivamente, Figura 16D). Por otro lado, se observó que luego de la administración de atropina (control parasimpático) los animales con HFpEF tratados con Veh mostraron una taquicardia significativamente menor en comparación a los animales Sham tratados con Veh (42.3 ± 7.0 vs. 80.9 ± 12.6 Δ latidos/min, $p < 0.05$, HFpEF+Veh vs. Sham+Veh, respectivamente, Figura 16E), evidenciando una disminución del componente vagal. Sin embargo, la eliminación selectiva de las neuronas C1 del RVLM con la toxina D β H+SAP no restableció la disminución del componente parasimpático en los animales con HFpEF (52.8 ± 6.5 vs. 42.3 ± 7.0 Δ latidos/min, HFpEF+D β H-SAP vs. HFpEF+Veh, respectivamente, Figura 16E).

Adicional al bloqueo farmacológico con propranolol y atropina, se determinó el balance simpático/vagal por medio del análisis de la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV) en el

dominio de la frecuencia. Los animales HFpEF tratados con vehículo (Veh) mostraron un incremento en el componente LF_{HRV} (70.6 ± 2.6 vs. 54.6 ± 3.4 n.u., $p < 0.05$, vs. HFpEF+Veh vs. Sham+Veh, respectivamente, Figura 17A, B) y una disminución del componente HF_{HRV} (28.1 ± 2.5 vs. 44.1 ± 3.6 n.u., $p < 0.05$, HFpEF+Veh vs. Sham+Veh, respectivamente, Figura 17A, C) en comparación a los animales Sham. Por consiguiente, y consistente con los resultados anteriores (Figuras 9 y 12), los animales HFpEF tratados con vehículo mostraron una razón LF/HF aumentada en comparación a los animales Sham tratados con vehículo (2.7 ± 0.3 vs. 1.3 ± 0.2 , $p < 0.05$, HFpEF+Veh vs. Sham+Veh, respectivamente, Figura 17A, D). Los animales HFpEF tratados con la toxina $D\beta H$ -SAP mostraron una normalización en las perturbaciones de HRV. En efecto, tanto el componente LF_{HRV} como HF_{HRV} fueron normalizados por la toxina $D\beta H$ -SAP en los animales con HFpEF (LF_{HRV} : 59.1 ± 2.9 vs. 70.6 ± 2.6 n.u. $p < 0.05$, HFpEF+ $D\beta H$ -SAP vs. HFpEF+Veh, respectivamente; HF_{HRV} : 40.6 ± 2.9 vs. 28.1 ± 2.5 n.u. $p < 0.05$, HFpEF+ $D\beta H$ -SAP vs. HFpEF+Veh, respectivamente. ; Figuras 17A, B, C). Por consiguiente, después de la destrucción selectiva de las neuronas C1 de la RVLM los animales con HFpEF mostraron una normalización de la razón LF/HF del HRV comparado a los animales HFpEF+Veh (1.5 ± 0.1 vs. 2.7 ± 0.3 , $p < 0.05$, HFpEF+ $D\beta H$ -SAP vs. HFpEF+Veh, respectivamente, Figura 17A, D).

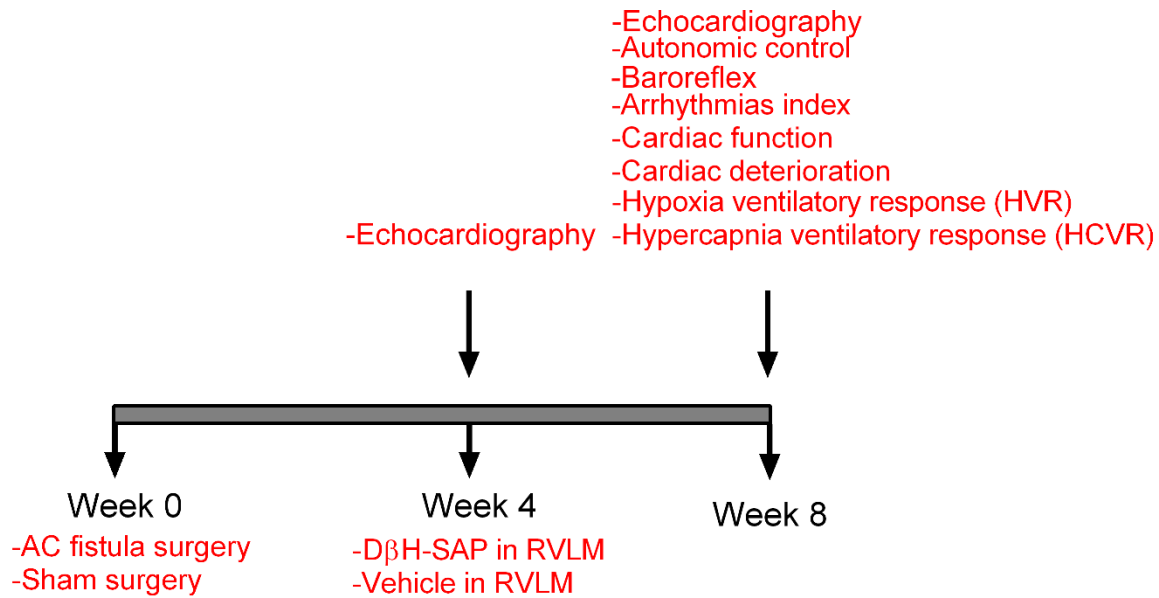


Figura 15. Diseño experimental para determinar el efecto de la destrucción selectiva de las neuronas C1 de la RVLM en ratas HFpEF. A la semana 0 se indujo la insuficiencia cardíaca con fracción eyectada preservada (HFpEF), a través de una fistula arteriovenosa (AC). A la semana 4 se midieron parámetros ecocardiográficos, para determinar el grado de HF, luego se realizó la inyección estereotáxica de la toxina dopamina-beta hidroxilasa saporina (D β H-SAP, 7.5 ng/150nl de NaCl 0.9%) o vehículo (Veh, NaCl 0.9%) en los animales Sham y HFpEF. A la semana 8 se evaluó ecocardiografía, el control autonómico, la sensibilidad del barorreflejo, la función cardíaca, hipertrofia cardíaca, remodelamiento cardíaco, incidencia de arritmias, la respuesta ventilatoria a la hipoxia (HVR) y a la hipercapnia (HCVR).

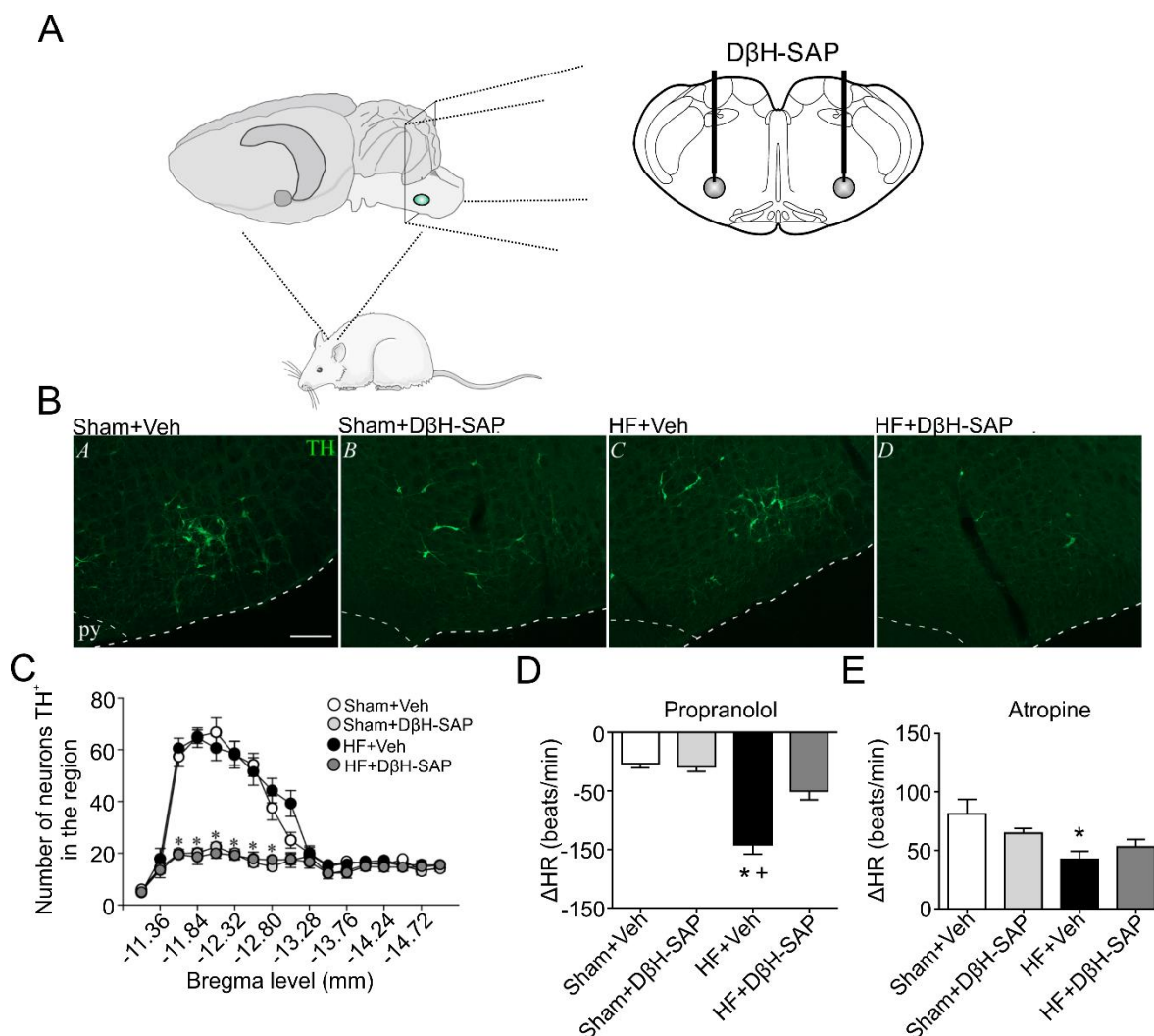


Figura 16. La destrucción selectiva de las neuronas C1 de la RVLM restablece el control simpático cardíaco en ratas con HFpEF. (A) Representación esquemática de la inyección estereotáxica bilateral en la RVLM de la toxina DβH-SAP o Veh. (B) Imágenes representativas de cortes histológicos coronales de la RVLM, donde se detectó las neuronas tirosina hidroxilasa positivas (TH⁺) de animales Sham y HFpEF, después de su respectiva eliminación selectiva con la toxina DβH-SAP. La inmunofluorescencia muestra una destrucción significativa de las neuronas TH⁺ en los animales Sham+DβH-SAP y HFpE+DβH-SAP. (C) Cuantificación del número y distribución de las neuronas TH⁺ de la RVLM. Se puede observar, que los animales Sham y HFpEF, a los cuales se les administro la toxina DβH-SAP, presentan una disminución significativa del número de neuronas TH⁺ en la RVLM. (D) El aumento del componente simpático que está exacerbado en los animales

HFpEF tratados con Veh, fue restablecido por la toxina D β H-SAP, sin cambios significativos entre los animales Sham+Veh y Sham+D β H-SAP. (E) El componente parasimpático, el cual esta disminuido en la condición de HFpEF+Veh no fue restablecido por la toxina D β H-SAP. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Veh; +, $p < 0.01$ vs. Sham+D β H-SAP. Sham+Veh: n=8; Sham+D β H-SAP: n=6; HFpEF+Veh: n=8; HFpEF+D β H-SAP: n=8.

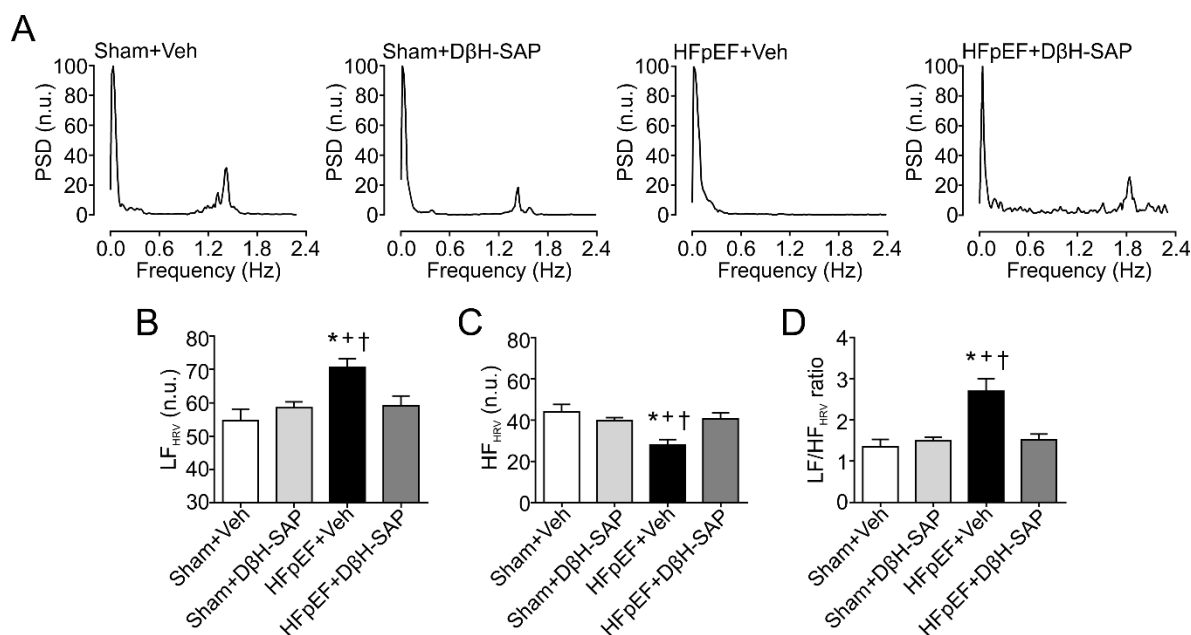


Figura 17. La destrucción selectiva de las neuronas C1 de la RVLM restablece las alteraciones en la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV) en ratas con HFpEF. (A) Espectros representativos de la HRV, de una rata Sham tratada con vehículo (Sham+Veh), una rata Sham tratada con la toxina DβH-SAP (Sham+DβH-SAP), una rata HFpEF tratada con Veh (HFpEF+Veh) y una rata HFpEF tratada con la toxina DβH-SAP (HFpEF+DβH-SAP). (B, C, D) Cuantificación del componente de baja frecuencia (B) (LF: 0.04-0.6 Hz), alta frecuencia (C) (HF: 0.6-2.4 Hz) y la razón LF/HF. (B) Los animales HFpEF+Veh mostraron un aumento del componente LF, en comparación a los animales Sham+Veh, lo cual fue restablecido por la toxina DβH-SAP. (C) Los animales HFpEF+Veh presentan una disminución del componente HF en comparación a los animales Sham+Veh, lo cual fue restablecido por la toxina DβH-SAP. (D) La razón LF/HF está aumentada en los animales HFpEF+Veh vs. Sham+Veh, lo cual fue restablecido por la toxina DβH-SAP. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Veh; +, $p < 0.01$ vs. Sham+DβH-SAP; †, $p < 0.01$ vs. HF+DβH-SAP. Sham+Veh: $n=8$; Sham+DβH-SAP: $n=6$; HFpEF+Veh: $n=8$; HFpEF+DβH-SAP: $n=8$.

8.6.- El deterioro de la función cardíaca y la mayor incidencia de arritmias en los animales con HFpEF disminuyen al eliminar neuronas C1 del RVLM.

La progresión de la patología fue evaluada, a través de ecocardiografía en modo-M. Se determinaron los diámetros del ventrículo izquierdo en diástole (LVEDD) y sístole (LVESD) a la semana 4 y 8 después en animales Sham o HFpEF. Los animales con HFpEF que fueron tratados con la toxina D β H-SAP no mostraron cambios significativos en el LVEDD ni tampoco en el LVESD en comparación a los animales HFpEF tratados con vehículo (Veh) a las 4 y ni a las 8 semanas (Figura 18A). Sin embargo, los animales HFpEF+Veh mostraron un deterioro progresivo significativo de la fracción de acortamiento (FS) (59.3 ± 5.1 vs. 45.0 ± 1.4 %, $p < 0.05$, HFpEF+Veh 4 semanas vs. HFpEF+Veh 8 semanas, respectivamente, Figura 18 A, B), lo cual fue parcialmente revertido por la toxina D β H-SAP en los animales HFpEF (57.2 ± 4.7 vs. 51.0 ± 4.8 %, $p > 0.05$, HFpEF+D β H-SAP 4 semanas vs. HFpEF+D β H-SAP 8 semanas, respectivamente, Figura 18 A, B). No se observaron cambios significativos en la fracción eyectada entre todas las condiciones experimentales (Figura 18B y C).

El resultado previo sugiere que la función cardíaca podría ser mejorada por la destrucción de neuronas pre simpáticas en la RVLM por medio de la toxina D β H-SAP. Los animales con HFpEF presentan un deterioro tanto de la función cardíaca diastólica, como de la función cardíaca sistólica en comparación a los animales Sham. El tratamiento con la toxina D β H-SAP en ratas con HFpEF restableció las propiedades pasivas del ventrículo (EDPVR: 0.005

± 0.0009 vs. 0.009 ± 0.001 mmHg/ μ l, $p < 0.05$, HFpEF+D β H-SAP vs. HFpEF+Veh, respectivamente, Figura 19 A, B) y la contractibilidad (ESPVR: 0.45 ± 0.10 vs. 0.26 ± 0.03 mmHg/ μ l, $p < 0.05$, HFpEF+D β H-SAP vs. HFpEF+Veh, respectivamente, Figura 19 A, C).

Se evaluó si la mejora en la función cardíaca en los animales con HFpEF luego de la ablación selectiva de neuronas C1 del RVLM dependió de cambios en el remodelamiento cardíaco, ya que se ha propuesto que el nivel de remodelamiento cardíaco puede alterar la función cardíaca. Por lo tanto, la mejora en la función podría ser una consecuencia de la mejora en el nivel de remodelamiento. Los animales HFpEF tratados con vehículo mostraron un aumento significativo en la hipertrofia cardíaca (Figura 20 A) y en las deposiciones de colágeno del ventrículo izquierdo en comparación a los animales Sham (7.75 ± 0.69 vs. 5.34 ± 0.44 %, HFpEF+Veh vs. Sham+Veh, respectivamente, Figura 20 B y C) y el tratamiento con D β H-SAP no modificó ni la hipertrofia cardíaca (Figura 20 A) ni los depósitos de colágeno en los animales HFpEF (7.71 ± 0.65 vs. 7.75 ± 0.69 %, HFpEF+D β H-SAP vs. HFpEF+Veh, respectivamente, Figura 20 B y C).

Luego, nos propusimos determinar los efectos de la ablación de neuronas C1 sobre la incidencia de eventos arrítmicos en HFpEF. El tratamiento con D β H-SAP logró disminuir la incidencia de arritmias cardíacas en los animales HFpEF (34.75 ± 8.78 vs. 71.5 ± 15.58 eventos/hora, $p < 0.05$, HFpEF+D β H-SAP vs. HFpEF+Veh, respectivamente, Figura 21 A, B)

sin observarse cambios significativos entre los animales Sham+Veh vs. Sham+D β H-SAP (Figura 21 A, B).

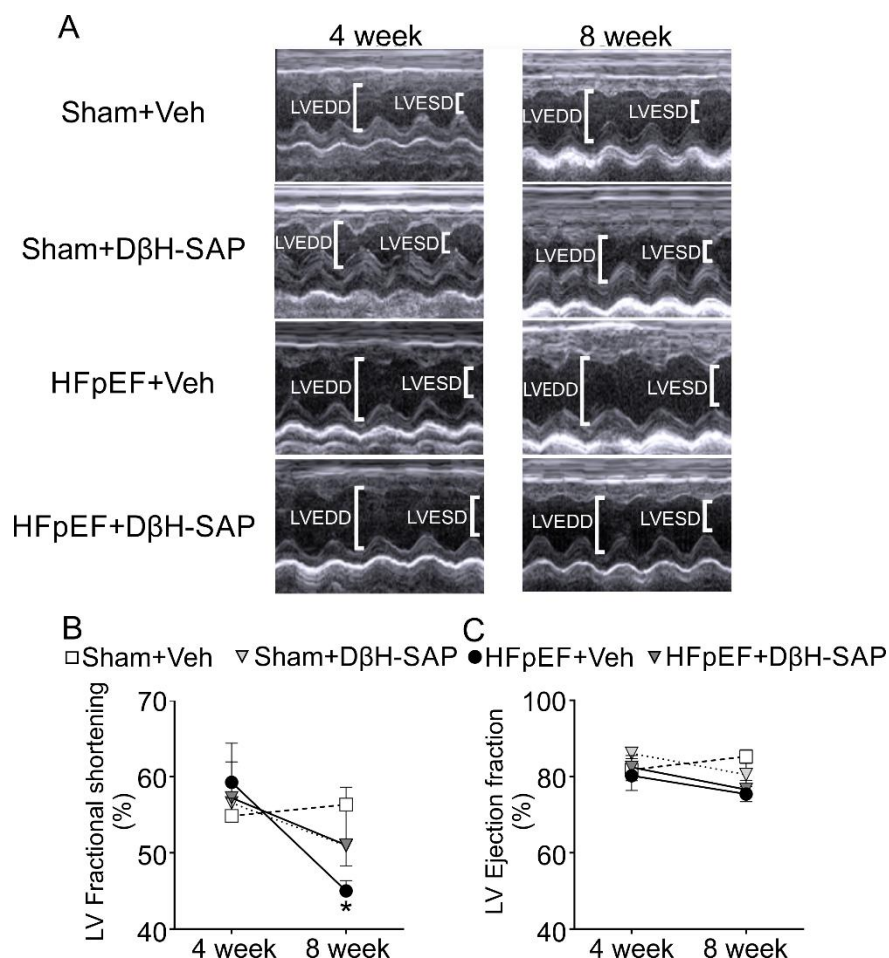


Figura 18. La eliminación selectiva de las neuronas C1 de la RVLM disminuye la progresión en el deterioro de la función cardíaca en ratas con HFpEF. (A) Imágenes representativas de una ecocardiografía en modo-M a las 4 y 8 semanas después de la inducción de la HFpEF. (B, C) Cuantificación de la fracción de acortamiento (FS) y fracción eyectada (EF) antes y después del tratamiento con vehículo (Veh) o la toxina DβH-SAP. (B) Los animales con HFpEF que fueron tratados con Veh mostraron una disminución progresiva del FS, la cual fue restablecida después de ser tratados con la toxina DβH-SAP. (C). No se observaron diferencias significativas en la EF de los animales Sham y HFpEF, tratados con Veh o la toxina DβH-SAP. ANOVA de dos factores, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Veh 4 semanas. Sham+Veh: $n=11$; Sham+DβH-SAP: $n=4$; HFpEF+Veh: $n=13$; HFpEF+DβH-SAP: $n=13$.

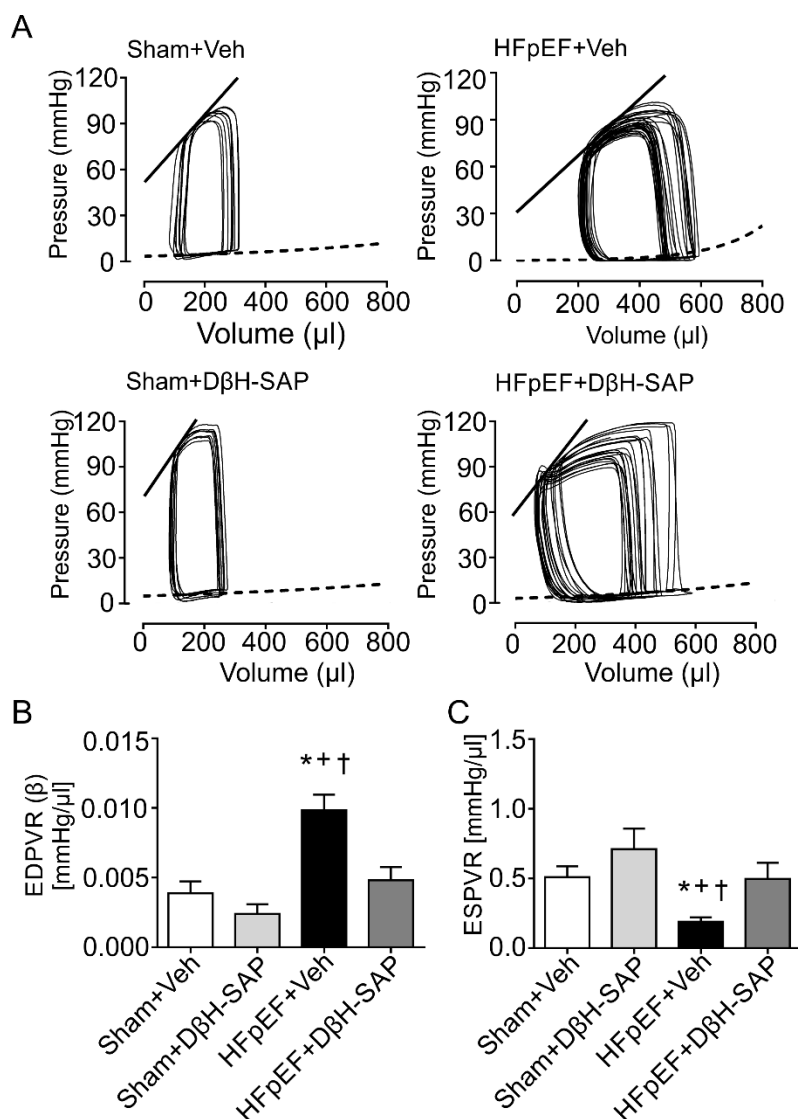


Figura 19. La destrucción selectiva de las neuronas C1 de la RVLM mejora la función cardíaca en ratas con HFpEF. (A) Imagen representativa de un loop presión-volumen durante la oclusión de la vena cava. Los animales con HFpEF tratados con vehículo (Veh) presentan un aumento del deterioro de la función cardíaca diastólica, medido por la relación presión volumen de fin de diástole (EDPVR, línea segmentada) y una disminución de la contractibilidad cardíaca, medido por la relación presión volumen de fin de sístole (ESPVR, línea continua). (E, F) Resumen de datos del EDPVR y del ESPVR. (E) Los animales HFpEF+Veh presentan un aumento significativo del EDPVR con respecto a la condición Sham+Veh, el cual es restablecido después del tratamiento con la toxina DβH-SAP. (F) Los animales HFpEF+Veh mostraron una disminución significativa del ESPVR en comparación

a los animales Sham, lo cual fue restablecido por la toxina D β H-SAP. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Veh; +, $p < 0.01$ vs. Sham+D β H-SAP; †, $p < 0.01$ vs. HFpEF+D β H-SAP ratas. Sham+Veh: n=8; Sham+D β H-SAP: n=6; HFpEF+Veh: n=8; HFpEF+D β H-SAP: n=8.

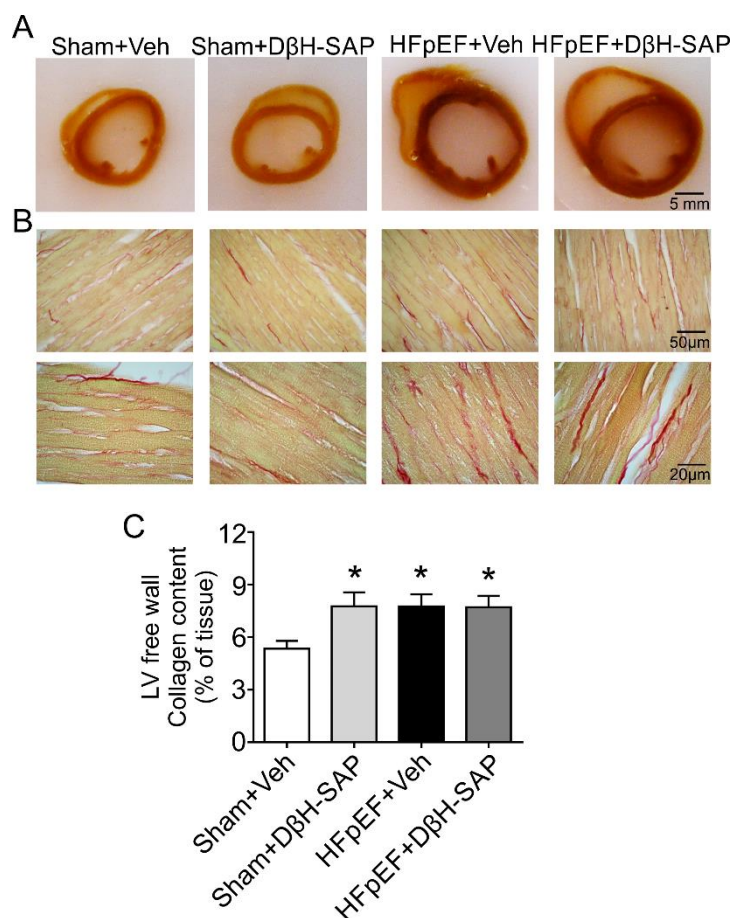


Figura 20. La hipertrofia y el remodelamiento cardíaco no fueron restablecidos por la eliminación selectiva de las neuronas C1 de la RVLM en ratas con HFpEF. (A) Imagen representativa transversal del corazón de una rata Sham tratada con vehículo (Sham+Veh), una rata Sham tratada con la toxina DβH-SAP (Sham+DβH-SAP), una rata HFpEF tratada con vehículo (HFpEF+Veh) y una rata HFpEF tratada con la toxina DβH-SAP (HFpEF+DβH-SAP). La destrucción selectiva de las neuronas C1 de la RVLM no mejora la hipertrofia cardíaca en las ratas HFpEF. (B) Imagen representativa del contenido de colágeno en el ventrículo izquierdo de una rata Sham+Veh, una rata Sham+DβH-SAP, una rata HFpEF+Veh y una rata HFpEF+DβH-SAP. Los animales HFpEF+Veh muestran un aumento en los depósitos de colágeno en el ventrículo izquierdo, lo cual no fue restablecido por la ablación selectiva de las neuronas C1 de la RVLM. (C) Resumen de datos del contenido de colágeno en el ventrículo izquierdo. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Veh, $n = 6$ por grupo.

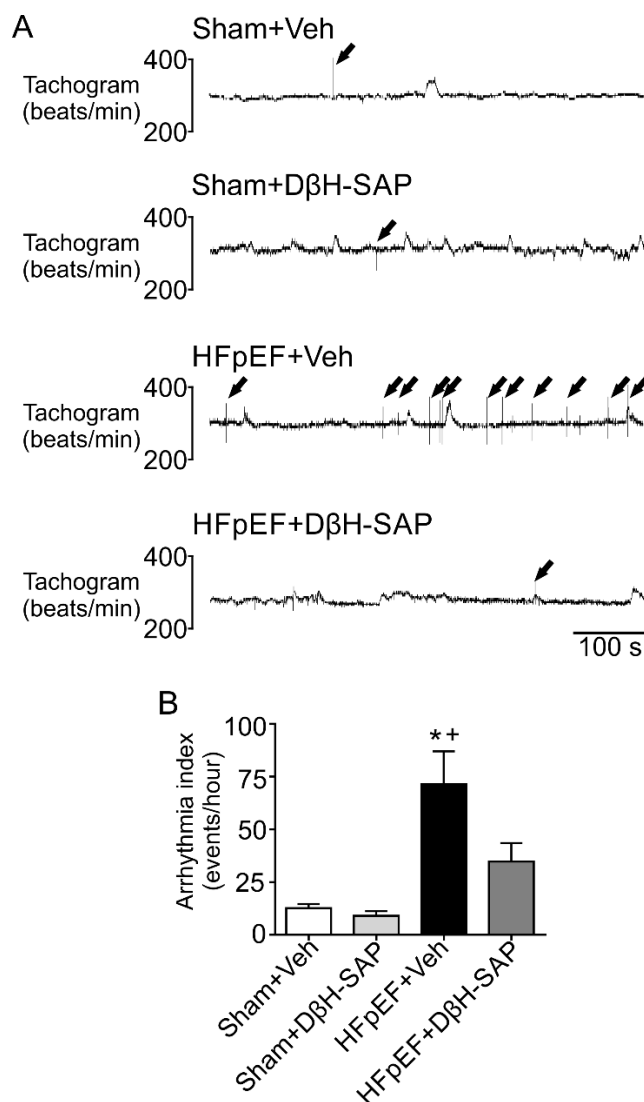


Figura 21. La destrucción selectiva de las neuronas C1 de la RVLM disminuye la incidencia de arritmias en ratas con HFpEF. (A) Registros representativos de la frecuencia cardíaca de una rata Sham tratada con vehículo (Sham+Veh), una rata Sham tratada con la toxina DβH-SAP (Sham+DβH-SAP), una rata HFpEF tratada con vehículo (HFpEF+Veh) y una rata HFpEF tratada con la toxina DβH-SAP (HFpEF+DβH-SAP). Los animales HFpEF+Veh presentan una mayor incidencia de arritmias, lo cual es restablecido por la toxina DβH-SAP. (B) Cuantificación de la incidencia de arritmias en todas las condiciones experimentales. Los animales HFpEF+Veh mostraron una mayor incidencia de arritmias en comparación a los animales Sham+Veh, lo cual fue restablecido por la toxina DβH-SAP. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Veh;

+, $p < 0.01$ vs. Sham+D β H-SAP. Sham+Veh: n=8; Sham+D β H-SAP: n=6; HFpEF+Veh: n=8; HFpEF+D β H-SAP: n=8.

8.7.- El deterioro de la función cardíaca inducido por la activación del quimiorreflejo central es dependiente de la integridad de las neuronas C1 de la RVLM.

Anteriormente se mostró que la activación aguda de los quimiorreceptores centrales con hipercapnia ($F_i\text{CO}_2$ 7%) induce un deterioro mayor de la función cardíaca diastólica en los animales con HFpEF. Para determinar si el efecto de la activación del quimiorreflejo sobre el deterioro de la función cardíaca y el incremento del control simpático son dependientes de las neuronas C1 de la RVLM, realizamos estimulación con hipercapnia ($F_i\text{CO}_2$ 7%) en los animales HFpEF a los cuales se les destruyó selectivamente las neuronas C1 de la RVLM. Similar a nuestros resultados previos, se observó que en condición de normoxia, las ratas HFpEF, presentan un deterioro de la función cardíaca diastólica y sistólica en comparación a los animales Sham y que la estimulación de los quimiorreceptores centrales empeora la función cardíaca diastólica (Figura 22). Observamos que este efecto deletéreo de la estimulación con hipercapnia sobre la disfunción cardíaca diastólica fue completamente abolido por la eliminación de neuronas C1 en animales con HFpEF (0.023 ± 0.008 vs. 0.005 ± 0.001 mmHg/ μl , $p < 0.05$, HFpEF+Veh+Hypercapnia vs. HFpEF+D β H-SAP+Hypercapnia, respectivamente, Figura 22 A y B). Adicionalmente, el aumento del control simpático cardíaco durante la estimulación con hipercapnia fue disminuido por el tratamiento con la toxina D β H-SAP en los animales con HFpEF (351.62 ± 82.07 vs. 200.32 ± 44.35 AUC,

$p < 0.05$, HFpEF+Veh+Hypercapnia vs. HFpEF+D β H-SAP+Hypercapnia, respectivamente, Figura 23 A-C).

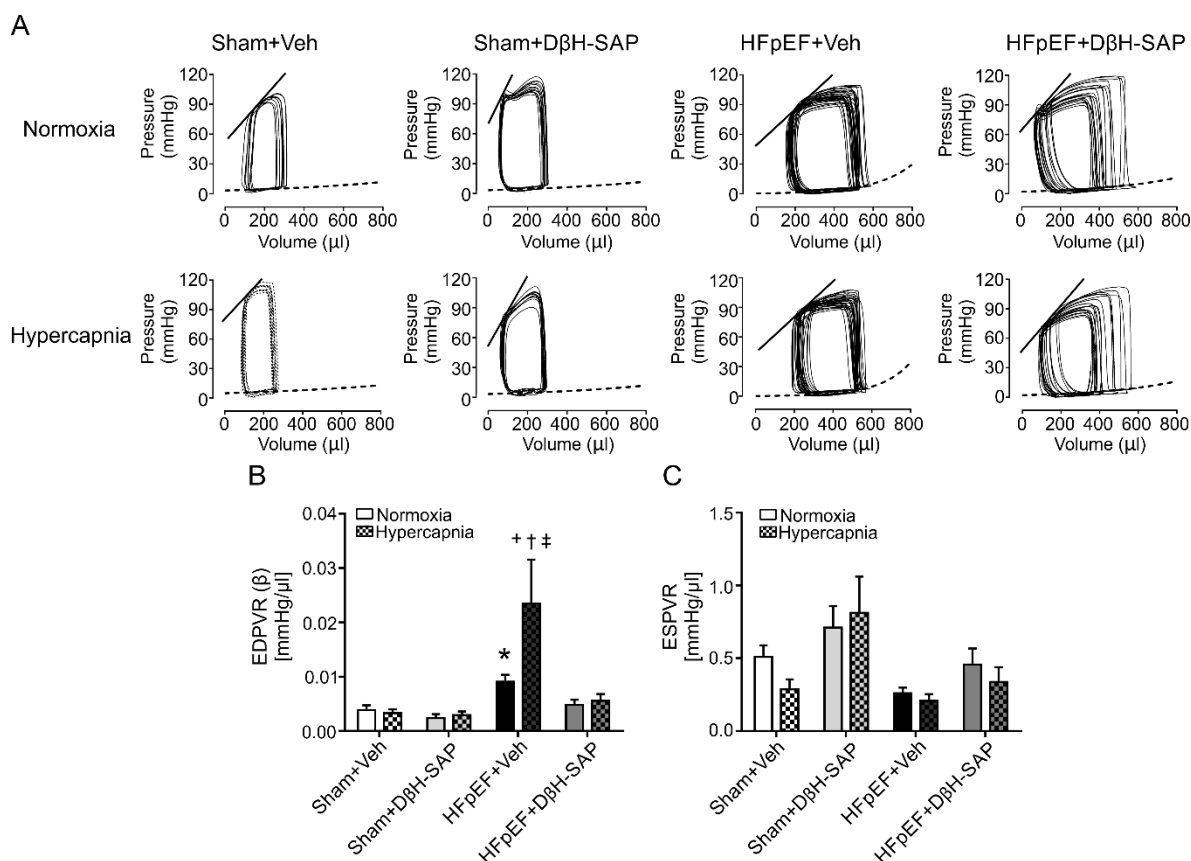


Figura 22. El deterioro de la función cardíaca diastólica inducido por la activación del quimiorreflejo central en ratas con HFpEF requiere de neuronas C1 de la RVLM. (A)

Imagen representativa de un loop presión-volumen durante la disminución de la precarga por la oclusión de la vena cava en normoxia (F_{iO_2} 21%) e hipercapnia (F_{iCO_2} 7%). Los animales HFpEF presentan un aumento en la relación presión-volumen de fin de diástole (EDPVR, línea segmentada) en normoxia en comparación a los animales Sham tratados con vehículo. Durante la estimulación con hipercapnia la función cardíaca diastólica (EDPVR) fue deteriorada aún más, en comparación a su condición de normoxia. Los animales Sham no mostraron modificaciones significativas sobre el EDPVR y el ESPVR. El deterioro sobre el EDPVR en los animales HFpEF inducido por la estimulación con hipercapnia es restablecido por la toxina DβH-SAP. La función cardíaca sistólica (ESPVR, línea continua) no fue afectada por la estimulación con hipercapnia en los animales Sham y HFpEF, tratados con Veh o la toxina DβH-SAP. (B, C) Cuantificación del EDPVR y el ESPVR durante normoxia e hipercapnia. (B) El deterioro del EDPVR en normoxia y su empeoramiento durante hipercapnia, fueron mejorados por el tratamiento con la toxina DβH-SAP. (C) No se

observaron diferencias significativas entre las condiciones experimentales. ANOVA de dos factores, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Veh hypercapnia; †, $p < 0.05$ vs. Sham+Veh hypercapnia; ‡, $p < 0.05$ vs. Sham+D β H-SAP hypercapnia; and §, $p < 0.05$ vs. HFpEF+D β H-SAP hypercapnia. Sham+Veh: n=8; Sham+D β H-SAP: n=6; HFpEF+Veh: n=8; HFpEF+D β H-SAP: n=8.

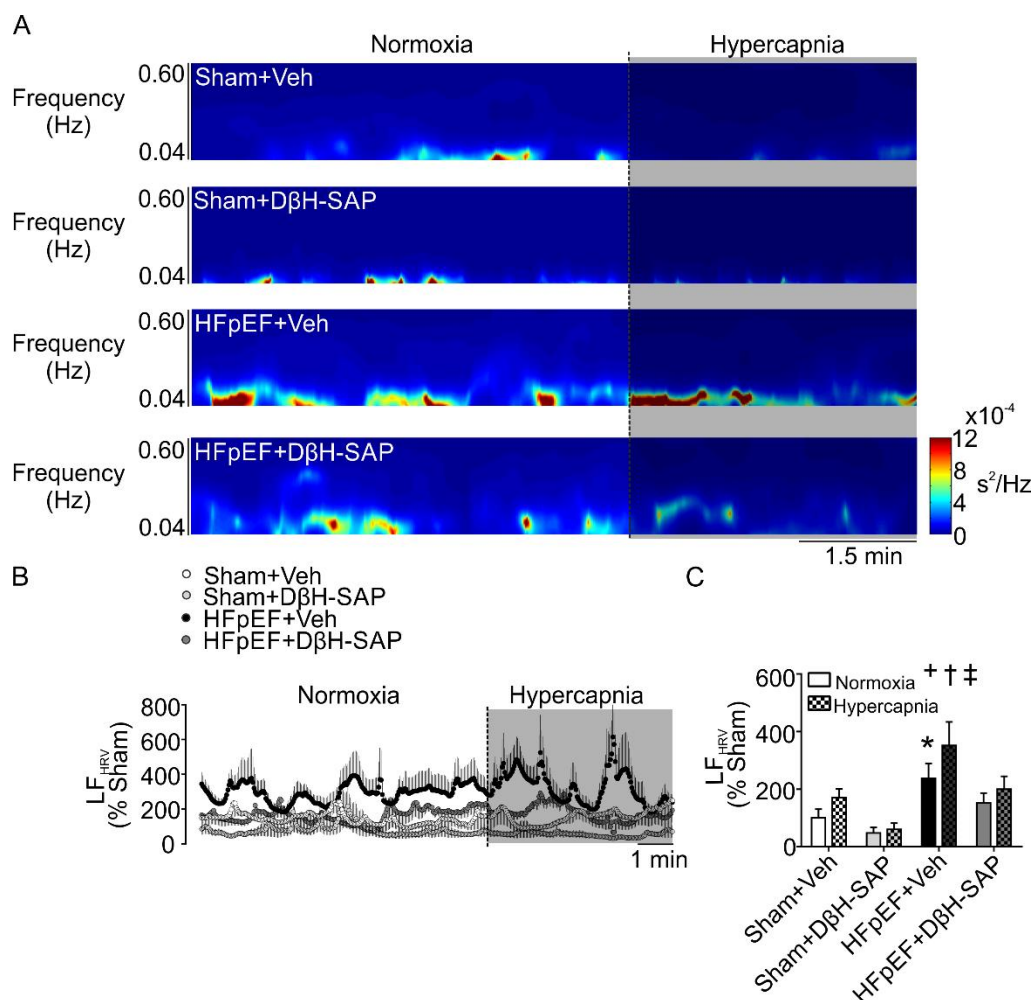


Figura 23. La activación simpática inducida por la activación del quimiorreflejo central con hipercapnia en ratas con HFpEF depende de la integridad de las neuronas C1 de la RVLM. (A) Espectro representativo de la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV) en el dominio tiempo-continuo variable durante normoxia (F_iO_2 21%) e hipercapnia (F_iCO_2 7%) de una rata Sham tratada con vehículo (Sham+Veh), una rata Sham tratada con la toxina DβH-SAP (Sham+DβH-SAP), una rata HFpEF tratada con vehículo (HFpEF+Veh) y una rata HFpEF tratada con la toxina DβH-SAP (HFpEF+DβH-SAP). La estimulación con hipercapnia induce un aumento del componente de baja frecuencia del HRV (LF, 0.04-0.6 Hz), lo cual fue restablecido por la toxina DβH-SAP. (B, C) Cuantificación del componente de baja frecuencia del HRV durante normoxia e hipercapnia. (B) Se puede observar que en condiciones de normoxia, los animales HFpEF+Veh presentan un aumento de la potencia espectral en el componente LF del HRV, el cual aumenta durante la estimulación con hipercapnia y es restablecido por la toxina DβH-SAP. (C) Cuantificación del área bajo la

curva (AUC) del componente LF del HRV en cada condición experimental. ANOVA de dos factores, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Veh hypercapnia; †, $p < 0.05$ vs. Sham+Veh hypercapnia; ‡, $p < 0.05$ vs. Sham+D β H-SAP hypercapnia; and ‡, $p < 0.05$ vs. HFpEF+D β H-SAP hypercapnia. Sham+Veh: n=8; Sham+D β H-SAP: n=6; HF+Veh: n=8; HFpEF+D β H-SAP: n=8.

8.8.- El mejoramiento de la función cardíaca y la reducción del tono simpático en animales con HFpEF luego de la eliminación de neuronas C1 no está asociado a la normalización en el control quimiorreflejo central

Para determinar si es que la mejora de la función cardíaca diastólica y la disminución del componente simpático durante la estimulación con hipercapnia en los animales con HFpEF tratados con D β H-SAP son dependientes de cambios en el quimiorreflejo central, nosotros evaluamos la respuesta ventilatoria a hipercapnia. La destrucción selectiva de las neuronas C1 de la RVLM, no modifica significativamente el quimiorreflejo central en los animales con HFpEF (55.25 ± 3.05 vs. 54.99 ± 2.18 ml/min/100g, $p < 0.05$, HFpEF+Veh vs. HFpEF+D β H-SAP, respectivamente, Figura 24 A-F). No se observaron cambios significativos en la respuesta quimiorrefleja a la hipoxia en todas las condiciones experimentales (Figura 24 A-F). Adicionalmente, se evaluó si es que la toxina D β H-SAP modifica el número de neuronas quimio-sensibles del RTN. Como se aprecia en el Figura 25, no se observaron cambios significativos en el número de neuronas quimiorreceptoras (TH (-); phox2b (+)) en el RTN.

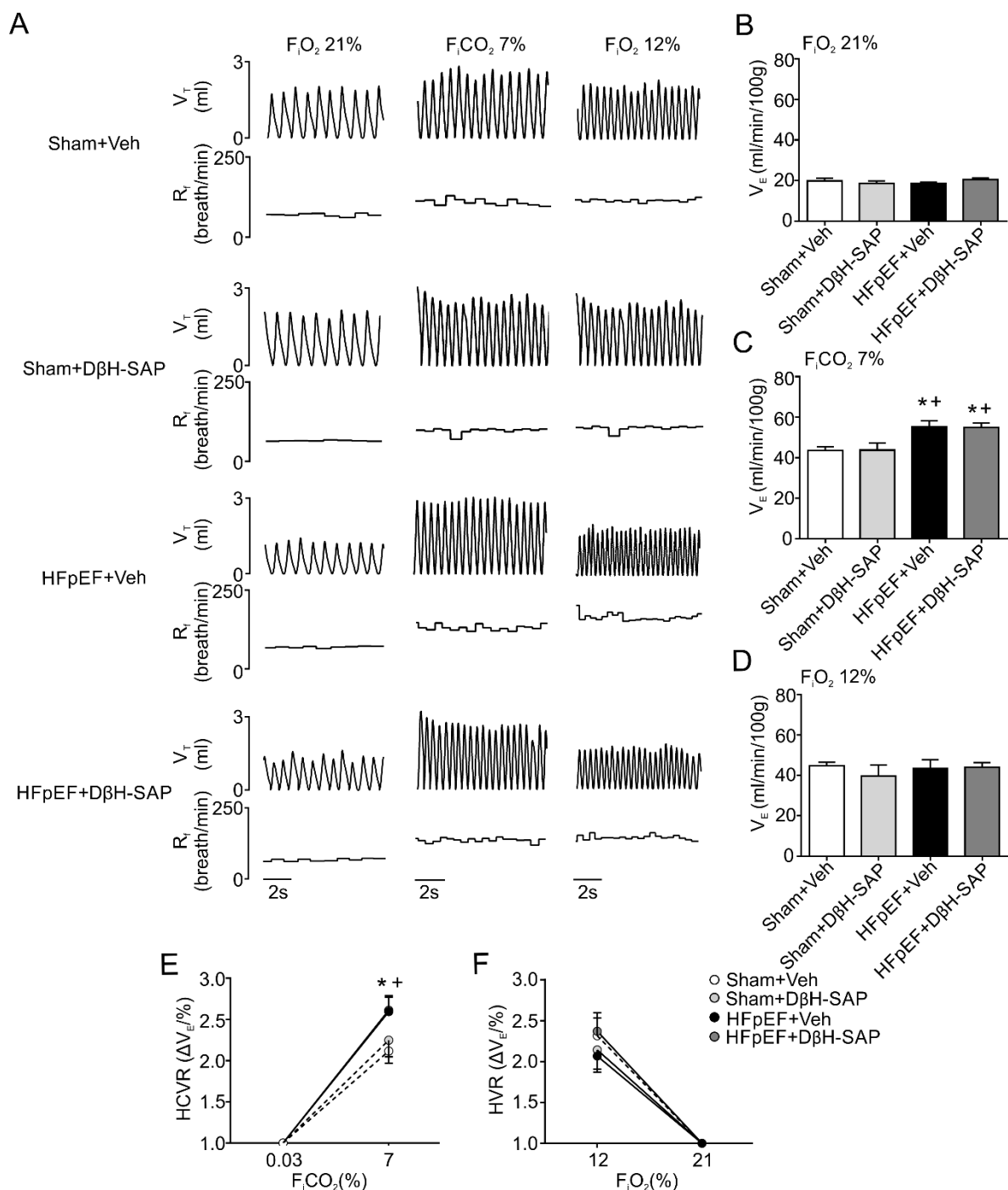


Figura 24. El quimiorreflejo central y periférico no es modificado por la eliminación selectiva de las neuronas C1 de la RVLM en ratas con HFpEF. (A) Registros representativos del volumen corriente (V_t) y la frecuencia respiratoria (R_f) en normoxia (F_{IO_2} 21%), hipoxia (F_{IO_2} 10%) e hipercapnia (F_{ICO_2} 7%) de una rata Sham tratada con vehículo (Sham+Veh), una rata Sham tratada con la toxina DβH-SAP (Sham+DβH-SAP), una rata HFpEF tratada con vehículo (HFpEF+Veh) y una rata HFpEF tratada con la toxina DβH-

SAP (HFpEF+D β H-SAP). Los animales HFpEF+Veh muestran un aumento significativo de la respuesta ventilatoria a la hipercapnia, sin cambios significativos en la respuesta ventilatoria a la hipoxia, en comparación a los animales Sham+Veh. La destrucción selectiva de las neuronas C1 de la RVLM no modifica la respuesta ventilatoria a la hipercapnia ni a la hipoxia en los animales Sham y HFpEF. (B-D) Resumen de datos de la ventilación minuto (V_E) en normoxia, hipercapnia e hipoxia, respectivamente. La respuesta a la hipercapnia está aumentada en las ratas HFpEF, y no es modificada tras la eliminación selectiva de las neuronas C1 de la RVLM. (E, F) La sensibilidad del quimiorreflejo central y periférico no fue alterada después de la eliminación selectiva de las neuronas C1 de la RVLM. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Veh; +, $p < 0.05$ vs. Sham+D β H-SAP. Sham+Veh: $n=8$; Sham+D β H-SAP: $n=6$; HFpEF+Veh: $n=8$; HFpEF+D β H-SAP: $n=8$.

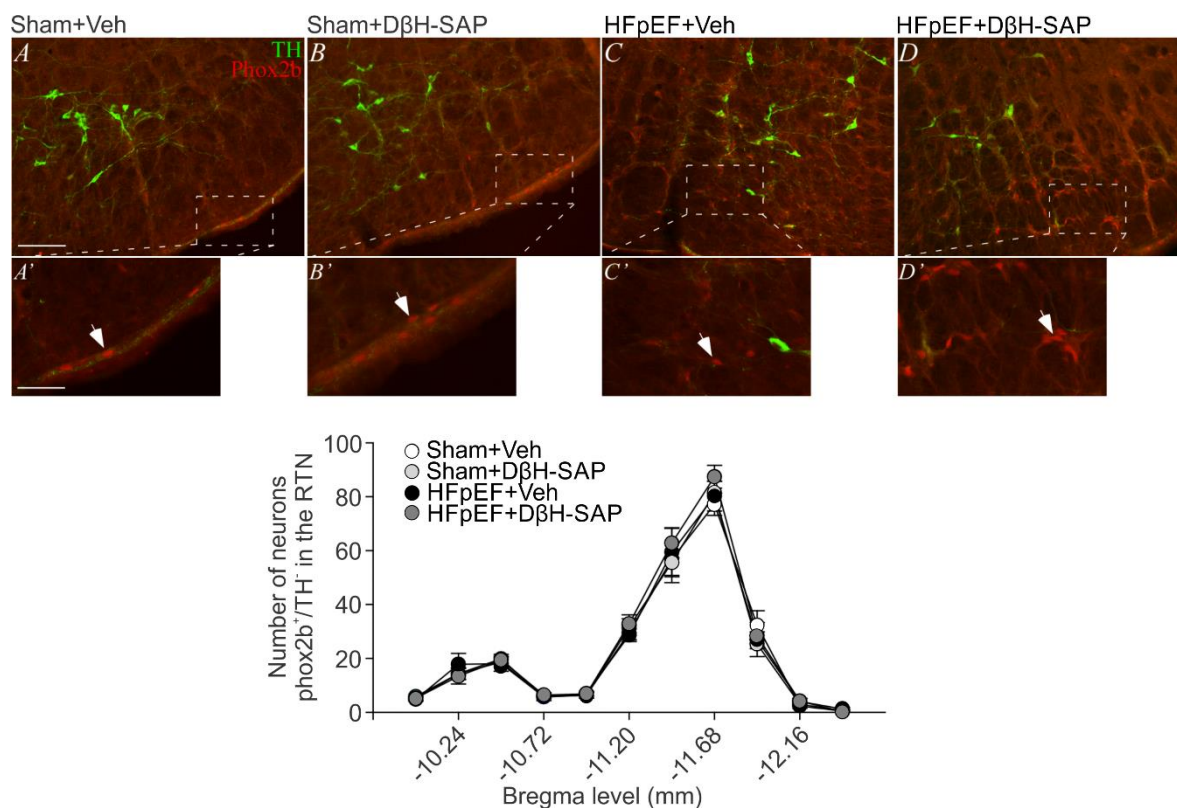


Figura 25. La toxina $D\beta H$ -SAP inyectada en la RVLM no reduce el número de neuronas quimiorreceptoras centrales del núcleo retrotrapezoide (RTN). (A) Imágenes coroneles representativas de la zona del RTN. La toxina $D\beta H$ -SAP inyectada en la RVLM no modifica el número de neuronas Phox2+, tirosina hidroxilasa negativa (TH-). Cuantificación del número de neuronas quimiorreceptoras centrales del RTN. $n=6$ por grupo.

8.9.- Efecto del ejercicio físico sobre variables fisiológicas basales en animales tolerantes al ejercicio.

En la figura 26 se puede observar el diseño experimental para determinar el efecto del ejercicio físico sobre la progresión de la HFpEF. El protocolo de entrenamiento consistió en una semana de adaptación, donde tanto la intensidad como el tiempo de entrenamiento se incrementaron progresivamente (Figura 27).

Las variables fisiológicas basales se muestran en la tabla 3. Después de 6 semanas de ejercicio físico (ExT), se observó que la masa del músculo soleo relativo al peso corporal (soleo/BW) incrementó significativamente ($p<0.05$) en los animales Sham+ExT y HFpEF+ExT en comparación a los animales Sham sedentarios (Sham+Sed) (Tabla 3) y HFpEF+Sed (Tabla 3), respectivamente. Adicionalmente, y similar a los resultados anteriores (Figura 2), los animales con HFpEF sedentarios (HFpEF+Sed) mostraron un incremento significativo en la hipertrofia cardíaca en comparación a los animales Sham+Sed ($p<0.05$), lo cual no fue restablecido por el ExT (Tabla 3). La presión arterial sistólica (SBP), la presión arterial diastólica (DBP), la presión de pulso (PP), la presión arterial media (MABP) y la frecuencia cardíaca (HR) no fueron significativamente diferentes entre los animales Sham+Sed y las ratas Sham+ExT (Tabla 3). La PP fue significativamente incrementada ($p<0.05$) en los animales con HFpEF+ExT en comparación a los animales HFpEF+Sed (Tabla 3).

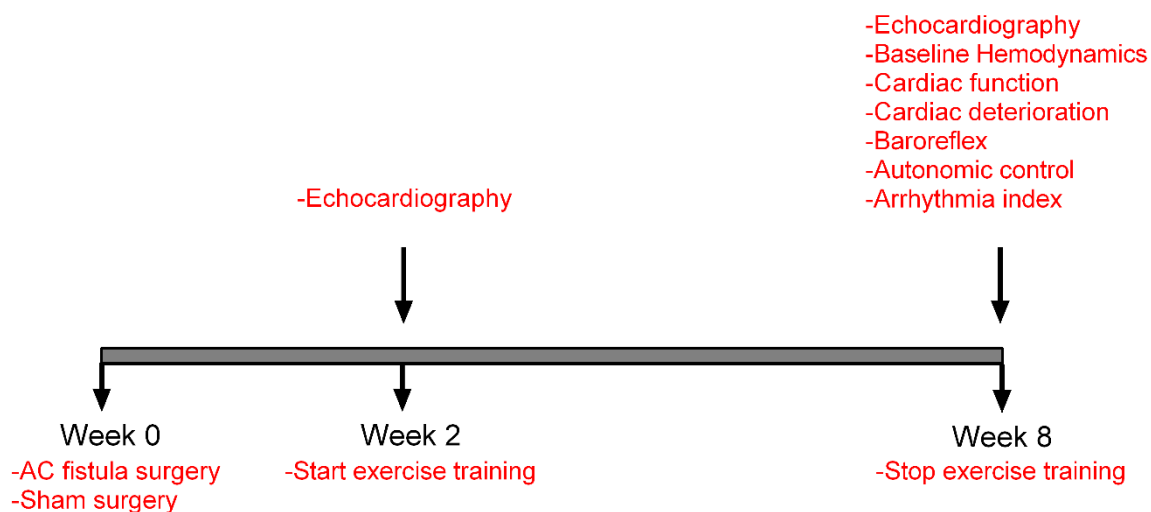


Figura 26. Diseño experimental para determinar el efecto del ejercicio físico sobre la progresión de la HFpEF. A la semana 0 se indujo la insuficiencia cardíaca con fracción eyectada preservada (HFpEF), a través de una fistula arteriovenosa (AC). A la semana 2 se determinó el grado de insuficiencia cardíaca, por medio de ecocardiografía en modo-M. Luego de esto, se dio inicio al protocolo de entrenamiento. Luego de 6 semanas de entrenamiento se evaluó el control autonómico, función cardíaca, hipertrofia cardíaca, remodelamiento cardíaco, incidencia de arritmias, barorreflejo cardíaco y estrés oxidativo en la RVLM.

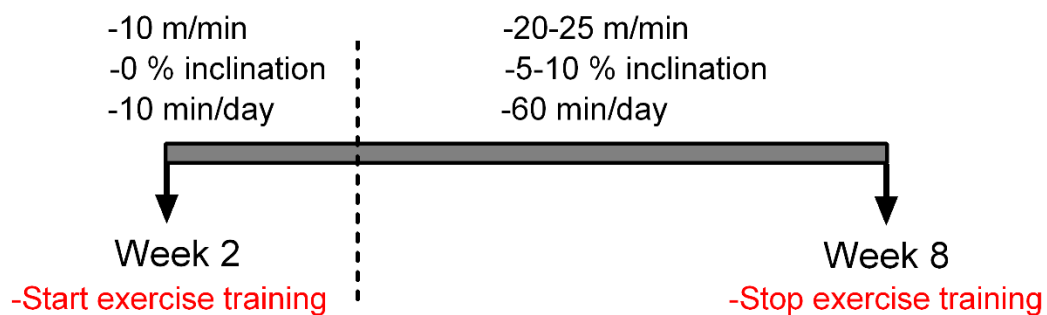


Figura 27. Protocolo de entrenamiento. El protocolo de entrenamiento fue de tipo endurance-resistencia el cual corresponde a ~80% de la frecuencia cardíaca máxima. La primera semana de entrenamiento inicio a una velocidad de 10 m/min, con 0% de inclinación y 10 minutos al día. Luego esto aumentó a 20-25 m/min, con 5-10% de inclinación, 60 min/día 5 veces por semana, durante 6 semanas.

Tabla 3. Efectos del ejercicio físico sobre parámetros fisiológicos basales.

	Sham+Sed	Sham+ExT	HFpEF+Sed	HFpEF+ExT
	(n=8)	(n=6)	(n=8)	(n=8)
BW (g)	498.01 ± 14.52	528.81 ± 32.25	534.90 ± 16.30	566.01 ± 16.01*
HW (g)	1.41 ± 0.01	1.42 ± 0.11	2.07 ± 0.17* ⁺	2.19 ± 0.12* ⁺
Soleus (g)	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.03*	0.18 ± 0.01 [†]	0.23 ± 0.01
HW/BW (mg/g)	2.91 ± 0.11	2.71 ± 0.15	3.72 ± 0.33*	3.88 ± 0.20*
Soleus/BW (mg/g)	0.38 ± 0.02	0.44 ± 0.01*	0.35 ± 0.01 [†]	0.41 ± 0.01
Lung W/D (g/g)	4.14 ± 0.07	4.29 ± 0.04	4.24 ± 0.09	4.57 ± 0.11
SBP (mmHg)	104.60 ± 3.99	86.47 ± 2.62	103.60 ± 5.38	111.20 ± 4.20
DBP (mmHg)	72.57 ± 5.11	58.95 ± 3.92	68.46 ± 4.31	55.71 ± 3.33*
MABP (mmHg)	83.58 ± 4.42	68.67 ± 4.82	80.16 ± 4.52	74.13 ± 2.97
PP (mmHg)	32.05 ± 2.36	29.16 ± 3.02	35.09 ± 2.65 [†]	55.53 ± 4.49*
HR (latidos/min)	344.20 ± 11.90	361.01 ± 18.11	318.30 ± 16.15	375.30 ± 12.88

Los valores están expresados como media ± error estándar de la media (S.E.M.). HW/BW: peso del corazón/peso corporal; Lung W/D: Pulmón húmedo/seco; SBP: presión arterial sistólica; DBP: presión arterial diastólica; MABP: presión arterial media; PP: presión de pulso; HR: frecuencia cardíaca. * Vs. Sham+Sed, $p < 0.05$; ⁺ vs. HFpEF+Sed, $p < 0.05$; [†] vs. HFpEF+ExT, $p < 0.05$.

8.10.- Efecto del ejercicio físico sobre las variables hemodinámicas cardíacas basales en animales con HFpEF tolerantes al ejercicio.

Los parámetros cardíacos en reposo son mostrados en la tabla 4 y en la Figura 28. En comparación a los animales Sham+Sed, las ratas HFpEF+Sed mostraron un incremento significativo ($p<0.05$) del LVEDD (Tabla 4) y del LVEDV (Tabla 4). Los animales HFpEF+Sed mostraron claros signos de insuficiencia cardíaca comparado a los animales Sham+Sed, caracterizado por un incremento significativo ($p<0.05$) del LVEDP, mayor trabajo sistólico (stroke work [SW]), menos elastancia (Ea), mayor volumen eyectado (SV) y mayor gasto cardíaco (CO) (Tabla 4). Después de 6 semanas de entrenamiento físico el LVESD, LVESV, EF, FS, dP/dt max, dP/dt min y el TauW no fueron significativamente diferentes entre los grupos Sham+Sed vs. Sham+ExT y HFpEF+Sed.

Adicionalmente, se observó que los animales HFpEF+ExT mostraron un incremento significativo ($p<0.05$) en el LVESD y el LVESV en comparación a los animales HFpEF sedentarios (Tabla 4). Después de 6 semanas de ExT los animales HFpEF, mostraron una disminución parcial en la progresión del deterioro diastólico medido por el diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (LVEDD: 12.05 ± 3.55 vs. 5.51 ± 4.88 $\Delta\%$ de Pre entrenamiento, $p=0.056$, HFpEF+Sed vs. HFpEF+ExT, respectivamente) (Figura. 28A y B). En efecto, se observó que la LVEDP disminuyó en los animales HFpEF+ExT en comparación a los animales HFpEF sedentarios (Figura 29 A, B).

Tabla 4. Efectos del ejercicio físico sobre parámetros ecocardiográficos basales.

	Sham+Sed (n=8)		Sham+ExT (n=6)		HFpEF+Sed (n=8)		HFpEF+ExT (n=8)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
LVEDD (mm)	6.8 ± 0.1	5.6 ± 0.2	6.1 ± 0.3	5.9 ± 0.2	7.3 ± 0.2	8.2 ± 0.3	8.08 ± 0.2	8.4 ± 0.4
LVESD (mm)	3.4 ± 0.2	2.9 ± 0.2	3.2 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.9 ± 0.2	3.68 ± 0.3	3.8 ± 0.2	4.7 ± 0.4
LVEDV (μl)	239.5 ± 8.8	157.6 ± 16.4*	190.9 ± 17.1	178.3 ± 16.6	281.9 ± 21.8	349.6 ± 36.3*	355.7 ± 24.7	399.2 ± 42.3*
LVESV (μl)	47.8 ± 8.1	33.4 ± 4.4	41.8 ± 3.8	26.2 ± 2.8 [‡]	67.7 ± 9.9	60.1 ± 13.6	64.2 ± 9.2	110.8 ± 18.6* [†]
EF (%)	79.9 ± 3.6	77.6 ± 3.7	77.7 ± 1.4	85.3 ± 0.6	76.4 ± 2.5	83.8 ± 2.3	82.2 ± 1.7	73.2 ± 2.8
FS (%)	50.2 ± 4.0	47.7 ± 3.3	47.3 ± 1.5	55.1 ± 0.9	46.6 ± 2.1	55.1 ± 2.3	53.1 ± 1.9	44.5 ± 2.9

Los valores están expresados como media ± error estándar de la media (S.E.M.). LVEDV: volumen de fin de diástole del ventrículo izquierdo; ESV: volumen de fin de sístole; EF: fracción de eyección; FS: fracción de acortamiento. * vs. Sham+Sed Pre, $p < 0.05$; ⁺ vs. HFpEF+Sed Post, $p < 0.05$; [†] vs. HFpEF+ExT Pre, $p < 0.05$; [‡] vs. Sham+ExT Pre, $p < 0.05$.

Tabla 5. Efectos del ejercicio físico sobre parámetros hemodinámicos basales del análisis de loops presión-volumen.

	Sham+Sed (n=8)	Sham+ExT (n=6)	HFpEF+Sed (n=8)	HFpEF+ExT (n=8)
PV loop parámetros				
SV (μl)	173.60 ± 19.48	172.40 ± 25.11	344.50 ± 27.70*	289.4 ± 24.95
CO (ml/min)	53.33 ± 2.43	62.61 ± 9.97	122.50 ± 14.76*	104.81 ± 9.53
SW (mmHg/μl)	12,028 ± 970	12,038 ± 1,945	26,673 ± 3,062*	22,673 ± 2,530*
Ea (mmHg/μl)	0.61 ± 0.04	0.51 ± 0.09	0.27 ± 0.01*	0.34 ± 0.04*
dp/dt _{max} (mmHg/s)	8,260 ± 1,024	6,852 ± 1,236	8,057 ± 817	9,596 ± 756
dp/dt _{min} (mmHg/s)	-6,603 ± 372	-6,089 ± 596	-5,903 ± 646	-6,223 ± 387
Tau _w (ms)	9,62 ± 0.90	8.04 ± 0.71	8.92 ± 0.52	7,46 ± 0.60

Los valores están expresados como media ± error estándar de la media (S.E.M.). SV: volumen eyectado; CO: gasto cardíaco; SW: trabajo cardíaco; Ea: elastancia; dp/dt_{max}: primera derivada del máximo valor presión intraventricular en el tiempo; dp/dt_{min}: primera derivada del mínimo valor presión intraventricular en el tiempo; Tau_w: constate de relajación de West. * vs. Sham+Sed, p < 0.05; + vs. HFpEF+Sed, p < 0.05.

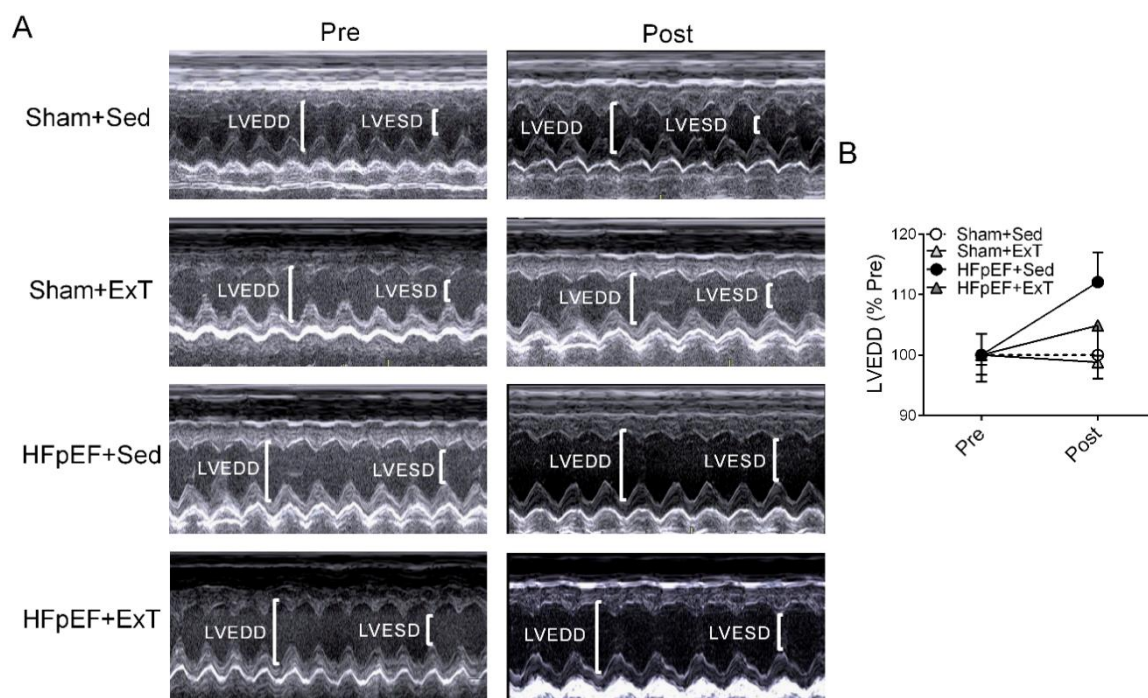


Figura 28. Efectos del ejercicio físico sobre la progresión del aumento en el diámetro de fin de diástole del ventrículo izquierdo (LVEDD) en ratas con HFpEF. (A) Imágenes representativas de una ecocardiografía en modo-M de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+ExT), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+ExT) antes (Pre) y después (Post) del entrenamiento. (B) Resumen de datos que muestran el efecto del ejercicio físico sobre la progresión del aumento del diámetro del ventrículo izquierdo durante el fin de la diástole (LVEDD). Los animales HFpEF sedentarios (HFpEF+Sed) ($p=0.056$), muestran un aumento en la progresión del LVEDD, el cual es parcialmente restablecido por el ejercicio físico (HFpEF+ExT). ANOVA de dos factores, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak.

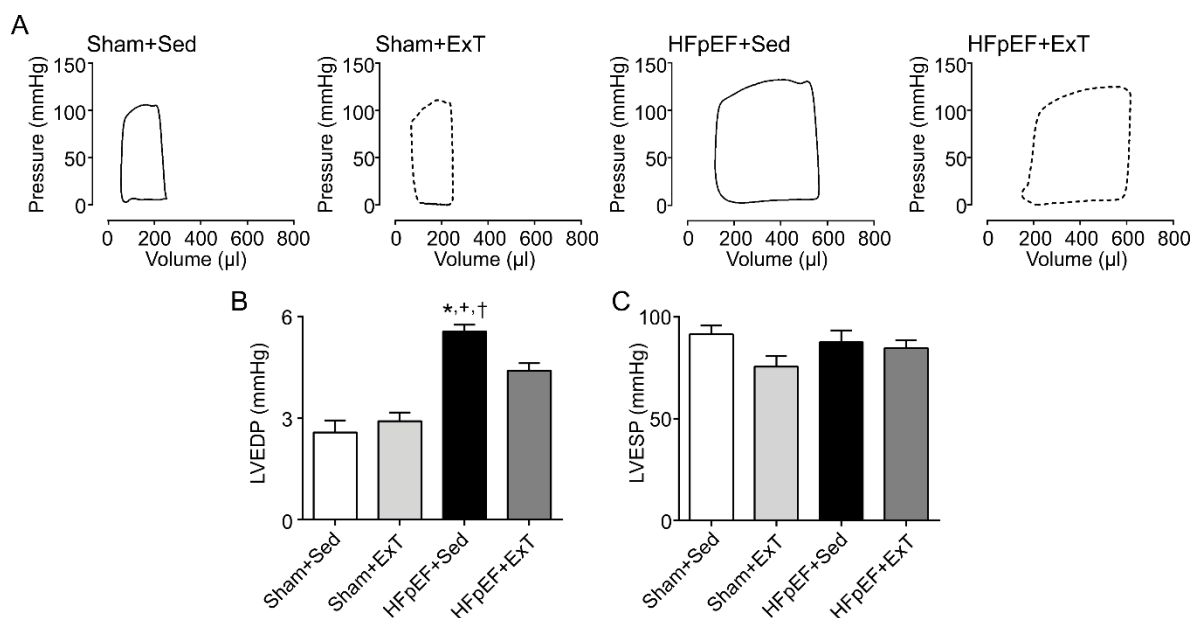


Figura 29. El ejercicio físico disminuye la presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo en ratas con HFpEF. (A) Registro representativo de un loop presión-volumen intraventricular en reposo de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+ExT), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+ExT). El ejercicio no muestra efectos aparentes en el ciclo cardíaco de los animales Sham y HFpEF. (B, C) Resumen de datos del efecto del ejercicio físico sobre la LVEDP y la presión de fin de sístole del LV (LVESP), respectivamente. (B) Los animales HFpEF sedentarios (HFpEF+Sed) muestran un aumento significativo del LVEDP en comparación a las ratas Sham+Sed, el cual es restablecido después de 6 semanas de ejercicio físico (HFpEF+ExT) (C) No se observaron modificaciones significativas en la LVESP entre las diferentes condiciones experimentales. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Sed; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Sed y; †, $p < 0.05$ vs. HFpEF+ExT. Sham+Sed, $n=8$; Sham+ExT, $n=6$; HFpEF+Sed, $n=8$; y HFpEF+ExT, $n=8$.

8.11.- Efecto del ejercicio físico sobre la función cardíaca en animales tolerantes al ejercicio.

El ejercicio físico mejora significativamente la función cardíaca sistólica en los animales HFpEF en comparación a los animales HFpEF sedentarios (0.47 ± 0.11 vs. 0.14 ± 0.03 mmHg/ μ l, $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 30 A, B). Sin embargo, la función cardíaca diastólica no fue alterada significativamente por el ejercicio físico en los animales HFpEF (0.0105 ± 0.0030 vs. 0.0098 ± 0.0011 mmHg/ μ l, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 30 A, C).

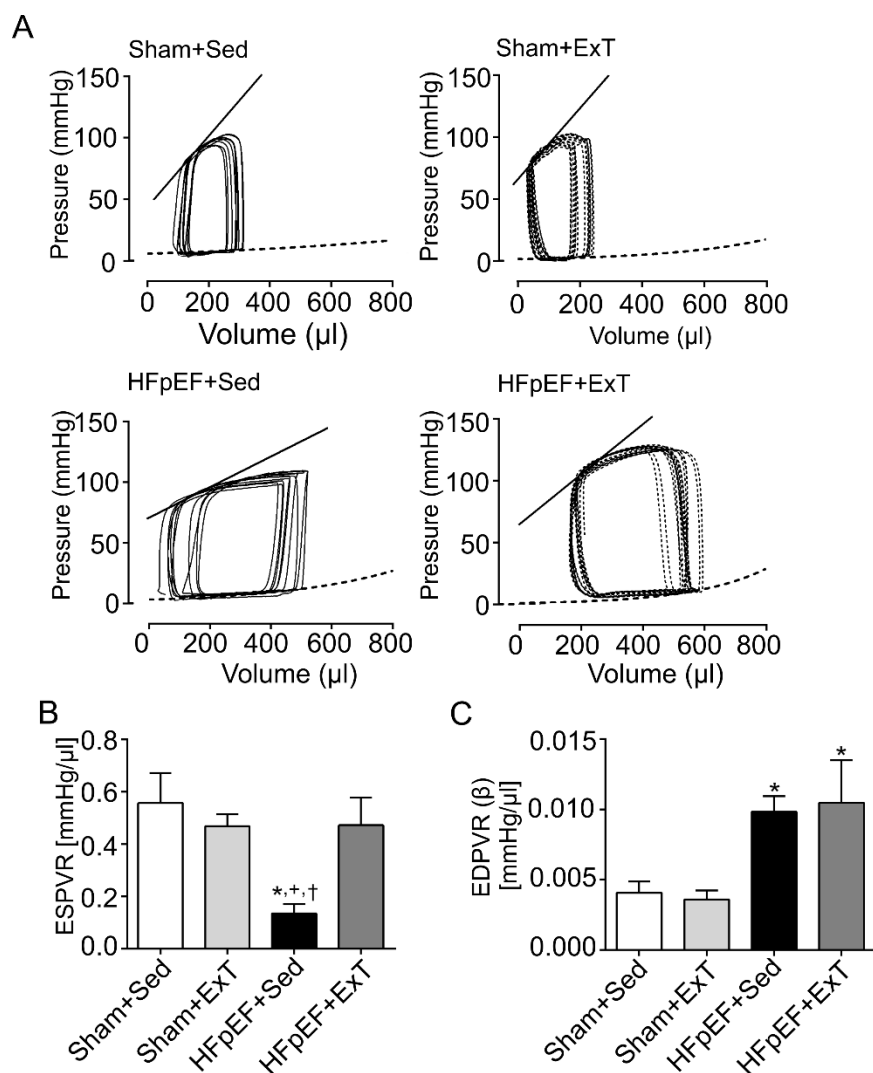


Figura 30. El ejercicio físico mejora la función cardíaca sistólica en ratas con HFpEF.

(A) Imagen representativa de un loop presión-volumen durante la oclusión de la vena cava de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+ExT), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+ExT). Los animales con HFpEF+Sed presentan un deterioro sistólico, medido por la relación presión volumen de fin de sístole (ESPVR, línea continua) y un deterioro diastólico, medido por la relación presión volumen de fin de diástole (EDPVR, línea segmentada) en comparación a los animales Sham+Sed. Después del entrenamiento los animales HFpEF mostraron una mejora del ESPVR, sin cambios significativos en el EDPVR. (B) Resumen de datos del efecto del ejercicio físico sobre el ESPVR. El ejercicio físico restablece la función cardíaca sistólica en las ratas HFpEF. (C) Resumen de datos del efecto

del ejercicio físico sobre el EDPVR. El ejercicio físico no mejora la función cardíaca diastólica en los animales HFpEF. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Sed; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Sed y; †, $p < 0.05$ vs. HFpEF+ExT. Sham+Sed, n=8; Sham+ExT, n=6; HFpEF+Sed, n=8; y HFpEF+ExT, n=8.

8.12.- Efecto del ejercicio físico sobre el control autonómico y el barorreflejo cardíaco en ratas con HFpEF.

Comparado a los animales HFpEF+Sed, las ratas HFpEF+ExT muestran una mejora en el control autonómico cardíaco, representando mayoritariamente por la disminución en el componente espectral LF del HRV (21.01 ± 5.54 vs. 48.07 ± 6.14 n.u., $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 31 A, B), un incremento significativo del componente HF del HRV (72.78 ± 2.73 vs. 47.46 ± 6.27 n.u., $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 31 A, C), y consecuentemente, una disminución de la razón LF/HF del HRV (0.39 ± 0.13 vs. 0.93 ± 0.15 , $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 31 A, D). Adicionalmente, se observó que después de 6 semanas de ejercicio físico los animales con HFpEF mostraron una mejora en el indicador no-lineal de variabilidad del ritmo cardíaco, SD2 (3.69 ± 0.38 vs. 2.26 ± 0.34 ms, $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente) (Figura 32 A, C),

Considerando que las ratas con HFpEF presentan una pérdida en la sensibilidad del BRS estudiamos los efectos del ejercicio físico sobre el BRS en animales con HFpEF. El ejercicio físico mejoró significativamente el BRS en los animales HFpEF que realizaron el entrenamiento en comparación con los HFpEF sedentarios (BRS_{DOWN}: 3.42 ± 0.40 vs. 1.34 ± 0.39 mmHg/ms, $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente; BRS_{UP}: 8.93 ± 3.62 vs. 1.41 ± 0.42 mmHg/ms, $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente; and

BRS Ganancia: 4.28 ± 0.91 vs. 1.35 ± 0.27 mmHg/ms, $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente) (Figura 33 A-E). No se observaron diferencias en el número de secuencias totales, DOWN y UP, entre todas las condiciones experimentales (Tabla 6).

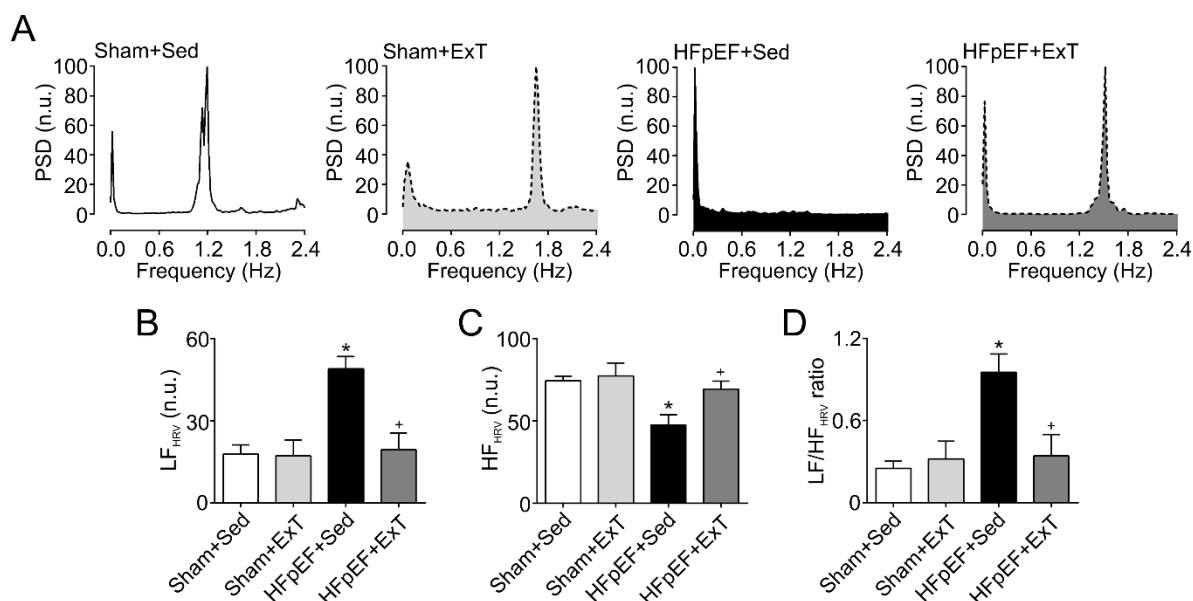


Figura 31. Efectos del ejercicio físico sobre la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV) en el dominio de la frecuencia de ratas con HFpEF. (A) Espectros representativos de la HRV de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+ExT), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+ExT). El ejercicio físico normaliza el HRV en el dominio de la frecuencia en las ratas HFpEF. (B, C, D) Resumen de los efectos del ejercicio físico sobre el componente de baja frecuencia (LF_{HRV}, 0.04-0.6 Hz) (B), alta frecuencia (HF_{HRV}, 0.6-2.4 Hz) (C) y la razón LF/HF del HRV (D). El ejercicio físico reduce el control simpático (B), el control parasimpático (C) y consecuentemente el balance autonómico (D) en las ratas HFpEF (HFpEF+ExT) en comparación a las ratas HFpEF+Sed. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Sed; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Sed y †, $p < 0.05$ vs. HFpEF+ExT. Sham+Sed, $n=8$; Sham+ExT, $n=6$; HFpEF+Sed, $n=8$; y HFpEF+ExT, $n=8$.

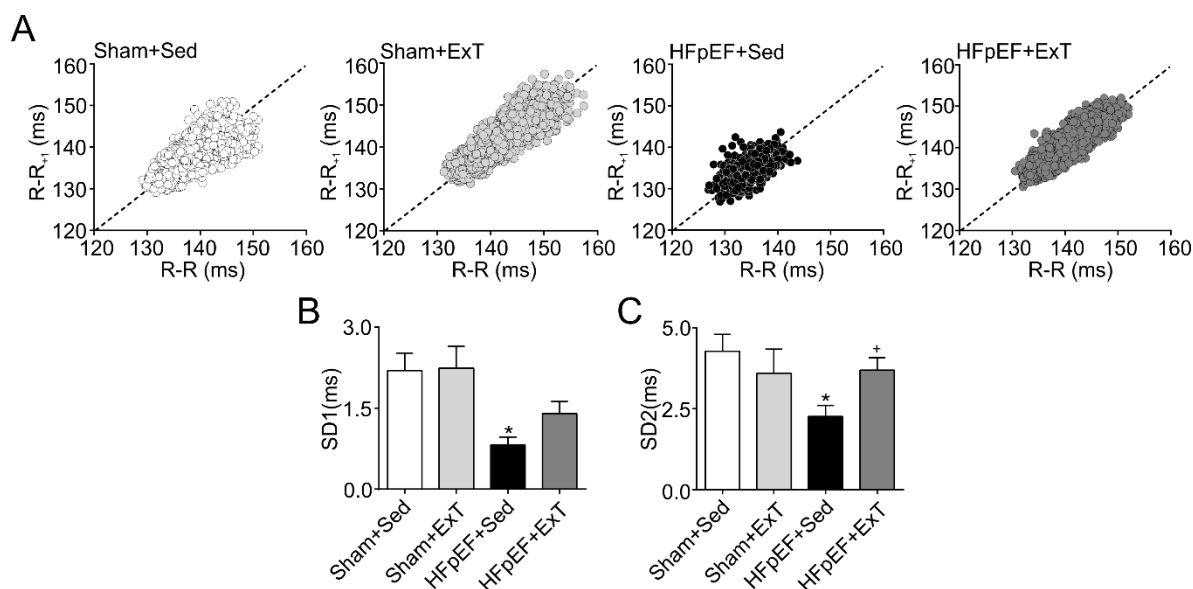


Figura 32. Efectos del ejercicio físico sobre la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV) en el dominio no lineal en ratas con HFpEF. (A) Potincares representativos de la HRV de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+ExT), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+ExT). El ejercicio físico restablece las alteraciones del HRV en el dominio no lineal, caracterizado por un restablecimiento de la variabilidad a corto (SD1) y largo plazo (SD2) en las ratas HFpEF. (B, C) Resumen de los efectos del ejercicio físico sobre el SD1) y SD2. (B) Las ratas HFpEF+Sed muestran una disminución significativa del SD1 en comparación a las ratas Sham+Sed, lo cual es restablecido por el ejercicio físico (HFpEF+ExT). (C) Las ratas HFpEF presentan una disminución significativa del SD2, sin embargo, esto no fue restablecido por el ejercicio físico. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Sed; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Sed. Sham+Sed, $n=8$; Sham+ExT, $n=6$; HFpEF+Sed, $n=8$; y HFpEF+ExT, $n=8$.

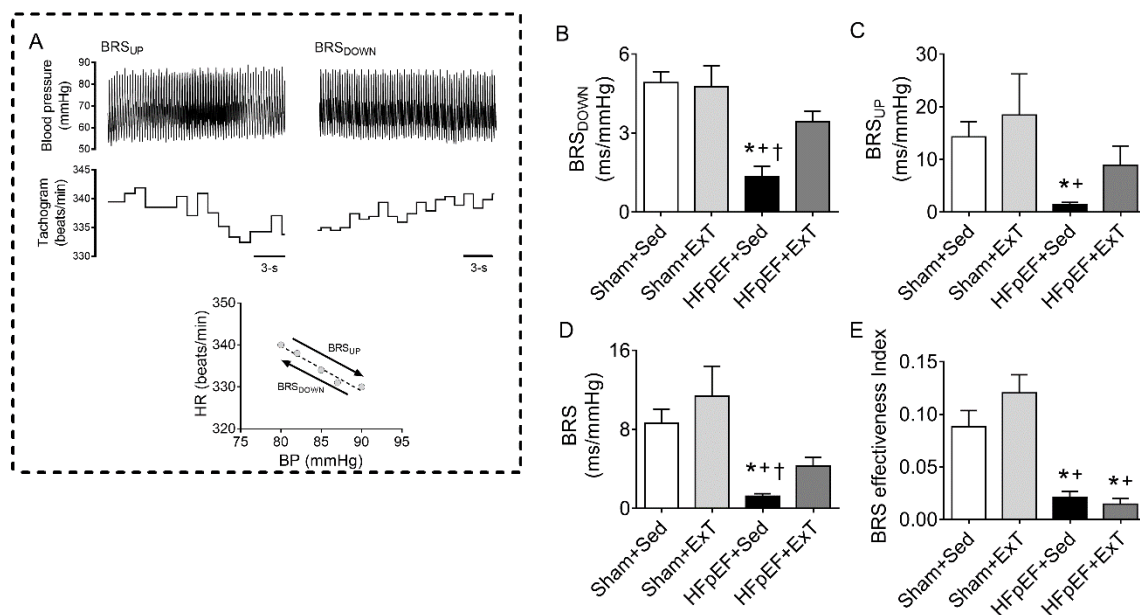


Figura 33. Efectos del ejercicio físico sobre la sensibilidad del barorreflejo espontáneo (BRS) en ratas con HFpEF. (A) Registro representativo de la presión arterial (BP) y frecuencia cardíaca (HR) durante una secuencia BRS_{UP} y una secuencia BRS_{DOWN}. Una secuencia BRS_{UP} es cuando la BP incrementa y el HR disminuye. Al contrario, una secuencia BRS_{DOWN} es cuando la BP disminuye y el HR incrementa. (Panel inferior A) Ejemplo de la cuantificación de una secuencia BRS_{UP} y BRS_{DOWN}. (C, D, E, F) Resumen del efecto del ejercicio físico sobre BRS_{DOWN}, BRS_{UP}, ganancia total del BRS y la efectividad del BRS, respectivamente. (C) Los animales HFpEF+Sed mostraron una disminución en la ganancia del BRS_{DOWN} en comparación a las ratas Sham+Sed, lo cual fue restablecido por el ejercicio físico (HFpEF+ExT). (D) El ejercicio fue incapaz de mejorar la ganancia del BRS_{UP} en las ratas HFpEF. (E) Los animales HFpEF+Sed mostraron una disminución en la ganancia del BRS_{UP} en comparación a las ratas Sham+Sed, lo cual fue restablecido por el ejercicio físico (HFpEF+ExT). (F) La efectividad del BRS no fue mejorada por el ejercicio físico en las ratas HFpEF... ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Sed; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Sed y †, $p < 0.05$ vs. HFpEF+ExT. Sham+Sed, $n=8$; Sham+ExT, $n=6$; HFpEF+Sed, $n=8$; y HFpEF+ExT, $n=8$.

Tabla 6. Efecto del ejercicio físico sobre el número de secuencias barorreflejas.

	Sham+Sed (n=8)	Sham+ExT (n=6)	HFpEF+Sed (n=8)	HFpEF+ExT (n=8)
Número total de secuencias	100.61 ± 22.27	81.01 ± 48.58	51.01 ± 34.91	73.13 ± 22.81
Numero de secuencias UP	19.71 ± 5.81	5.75 ± 1.65	11.53 ± 3.24	12.36 ± 3.86
Numero de secuencias DOWN	52.01 ± 13.46	35.01 ± 13.87	35.67 ± 10.27	17.01 ± 6.05

Los valores están expresados como media ± error estándar de la media (S.E.M.). UP: la presión arterial (BP) incrementa y la frecuencia cardíaca (HR) disminuye; DOWN: la BP disminuye y la HR aumenta.

8.13.- Efecto del ejercicio físico sobre estrés oxidativo y la expresión de enzimas pro y anti-oxidantes a nivel de la RVLM en ratas con HFpEF.

Se ha propuesto que uno de los mecanismos asociados al aumento de la actividad simpática es la presencia de altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la RVLM. Los animales con HFpEF+Sed mostraron un incremento significativo en la fosforilación de la subunidad regulatoria p-47phox (Ser 370) de la NOX-2 en la RVLM en comparación a los animales Sham+Sed (324.51 ± 39.62 vs. 100.00 ± 11.69 %, $p < 0.05$, HFpEF+Sed vs. Sham+Sed, respectivamente, Figura 34 A, B). Seis semanas de ejercicio físico disminuyeron la fosforilación de p-47phox en los animales HFpEF+ExT en comparación a las ratas HFpEF+Sed (73.75 ± 12.62 vs. 250.40 ± 45.17 %, $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 34 A, B). Además, el ejercicio físico no modificó la expresión de CuZn-SOD (Figura 34 A, C). Los niveles de superóxido en el RVLM de animales con HFpEF+Sed fueron mayores en comparación a los animales Sham+Sed (Figura 34D) y el ejercicio físico en HFpEF disminuyó el estrés oxidativo (Figura 34D). No se encontraron diferencias significativas en la fosforilación del p-47phox y/o en la expresión de CuZn-SOD entre animales Sham+Sed y Sham+ExT (p-47Phox: 100.0 ± 10.1 vs. 88.8 ± 8.2 %, Sham+Sed vs. Sham+ExT, respectivamente; CuZn-SOD: 100.0 ± 3.7 vs. 89.5 ± 15.6 %, in Sham+Sed vs. Sham+ExT, respectivamente) (Figura 34).

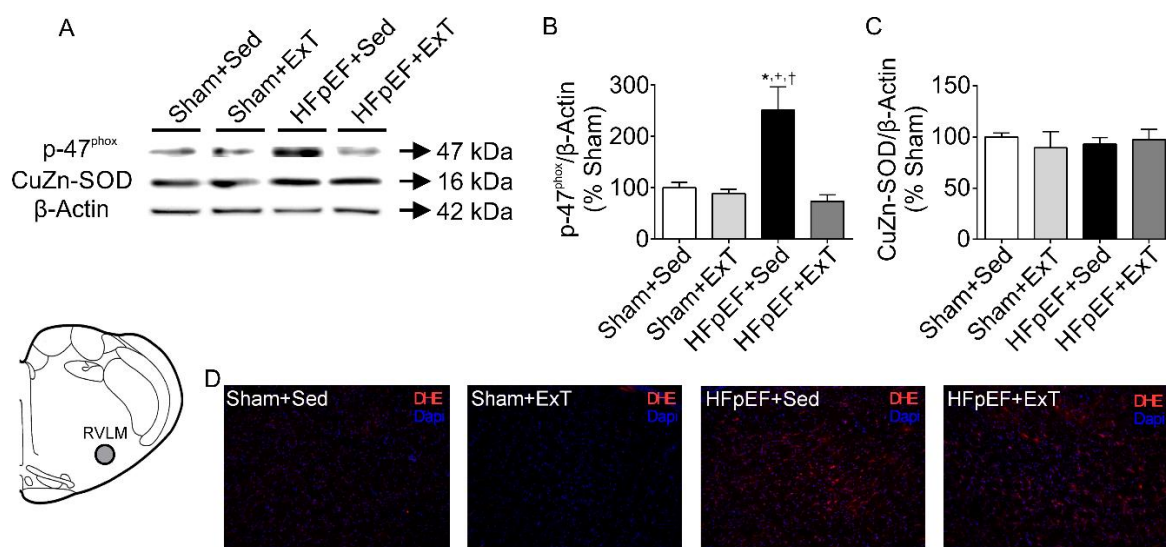


Figura 34. Efectos del ejercicio físico sobre la fosforilación de la NOX-2, la expresión de Cu-Zn-SOD y el estrés oxidativo de la RVLM en ratas con HFpEF. (A) inmunoblot representativo de la fosforilación de p-47^{phox} y la expresión de CuZn-SOD en la RVLM de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+ExT), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+ExT). El aumento en la fosforilación de p47^{phox} fue que se observa en los animales HFpEF+Sed es completamente restablecida después de 6 semanas de entrenamiento en las (HFpEF+ExT), sin cambios significativo en CuZn-SOD. (B, C) Cuantificación de los efectos del ejercicio físico sobre la fosforilación de p-47^{phox} y la expresión de CuZn-SOD en la RVLM. (D) Imágenes de la fluorescencia de dihidroetidio (DHE) en la RVLM de una rata Sham+Sed, una Sham+ExT, una HFpEF+Sed y una HFpEF+ExT (magnificación total 200x). El ejercicio disminuye la fluorescencia de DHE en la RVLM en los animales HFpEF (HFpEF+ExT). ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Sed; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Sed y; †, $p < 0.05$ vs. HFpEF+ExT. Sham+Sed, $n=8$; Sham+ExT, $n=6$; HFpEF+Sed, $n=8$; y HFpEF+ExT, $n=8$.

8.14.- Efecto del ejercicio físico sobre la incidencia de arritmias cardíacas en ratas con HFpEF.

La incidencia de arritmias cardíacas fue significativamente mayor en los animales HFpEF+Sed en comparación a los animales del grupo Sham+Sed (196.01 ± 84.81 vs. 19.81 ± 7.23 eventos/hora, $p < 0.05$, HFpEF+Sed vs. Sham+Sed, respectivamente, Figura 35 A, B). Después de 6 semanas de ejercicio físico, los animales HFpEF que entrenaron mostraron una disminución significativa en la incidencia de arritmias en comparación a la condición HFpEF sedentaria (28.50 ± 19.54 vs. 196.01 ± 84.81 eventos/hora, $p < 0.05$, HFpEF+ExT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 35 A, B).

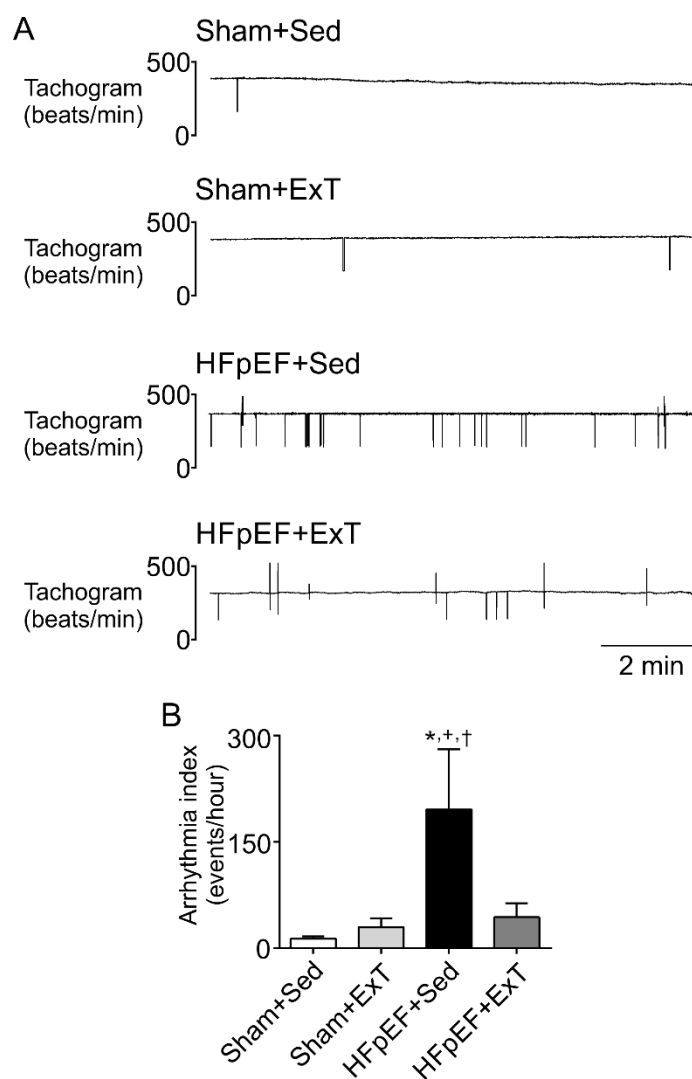


Figura 35. Efectos del ejercicio físico sobre las arritmias cardíacas en ratas con HFpEF.

(A) Registro representativo de la frecuencia cardíaca (HR) de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+ExT), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+ExT). El incremento en la incidencia de arritmias de los animales HFpEF+Sed, disminuye después de 6 semanas de ejercicio físico (HFpEF+ExT). (B) Cuantificación de los efectos del ejercicio físico sobre la incidencia de arritmias cardíacas en ratas HFpEF. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Sed; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+Sed y; †, $p < 0.05$ vs. HFpEF+ExT. Sham+Sed, $n=8$; Sham+ExT, $n=6$; HFpEF+Sed, $n=8$; y HFpEF+ExT, $n=8$.

8.15.- Tolerancia/intolerancia al ejercicio físico en animales con HFpEF.

Durante los experimentos observamos que existían ratas que no podían tolerar el ejercicio físico. Este contexto nos hizo proponer experimentos para caracterizar a esta población de ratas. Así, la intolerancia al ejercicio físico fue definida como la incapacidad de realizar más del 50% del entrenamiento planificado y fue detectada solo en los animales con HFpEF. En la figura 36 se muestra el diseño experimental para determinar la tolerancia/intolerancia al ejercicio físico. La proporción tolerancia/intolerancia fue de 56% y 44%, respectivamente (Figura 37 A). Con relación al resultado anterior, los tiempos de entrenamiento fueron significativamente menores en los animales HFpEF+EX-inT en comparación a los animales HFpEF+EX-T (31.8 ± 4.7 vs. 88.6 ± 11.6 % del Sham+EX, $p < 0.05$, HFpEF+EX-inT vs. HFpEF+EX-T, respectivamente, Figura 34 B). Por otro lado, para determinar si es que la disminución en los tiempos de entrenamiento por parte de las ratas HFpEF intolerantes al ejercicio físico se podía deber a algún tipo de atrofia muscular, se midió el peso del soleo en el peso corporal (soleus/BW). Así, se observó que el soleus/BW no fue aumentado significativamente en los animales intolerantes en comparación a los animales HFpEF sedentarios (100.0 ± 6.7 vs. 110.0 ± 2.1 % del Sham+Sed, HFpEF+Sed vs. HFpEF+EX-inT, respectivamente, Tabla 7). Antes de iniciar el entrenamiento (condición Pre), no se observaron diferencias significativas en LVESD, LVEDD, LVESV, LVEDV, EF y FS entre los grupos HFpEF+Sed, HFpEF+EX-T y HFpEF+EX-inT (Tabla 8).

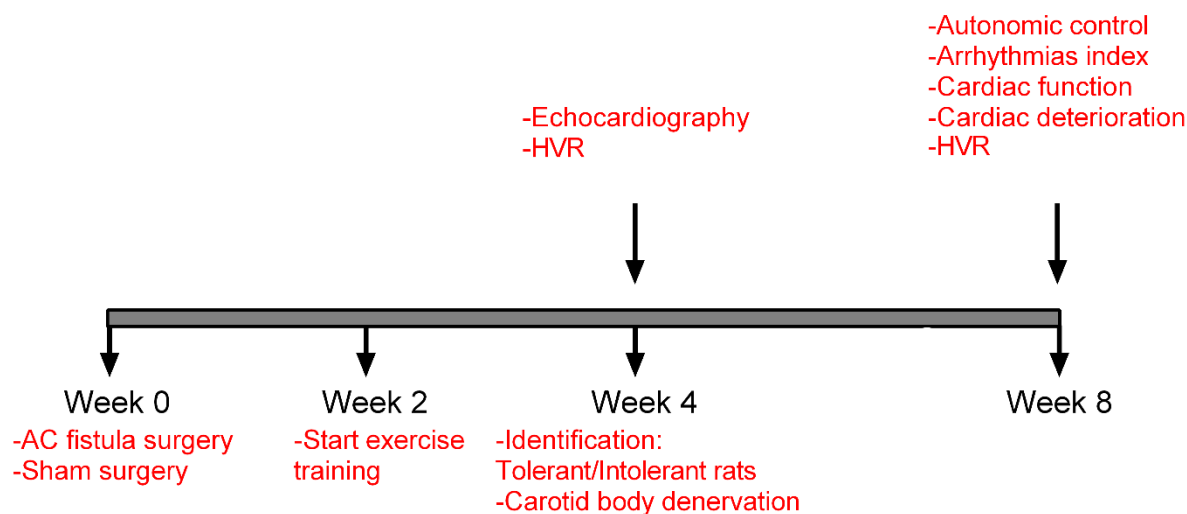


Figura 36. Diseño experimental para determinar el efecto del ejercicio físico sobre la tolerancia/intolerancia al ejercicio físico en ratas HFpEF. A la semana 0 se indujo la insuficiencia cardíaca con fracción eyectada preservada (HFpEF), a través de una fistula arteriovenosa (AC). A la semana 2 se determinó el grado de insuficiencia cardíaca, por medio de ecocardiografía en modo-M. Luego de esto, se dio inicio al protocolo de entrenamiento. A la semana 4 se determinó que animales eran intolerantes al ejercicio físico (<50% del tiempo de entrenamiento) y se procedió acortar los cuerpos carotideos en los animales tolerantes al ejercicio físico. Luego de 6 semanas de entrenamiento se evaluó el control autonómico, función cardíaca, incidencia de arritmias y la respuesta ventilatoria a la hipoxia (HVR).

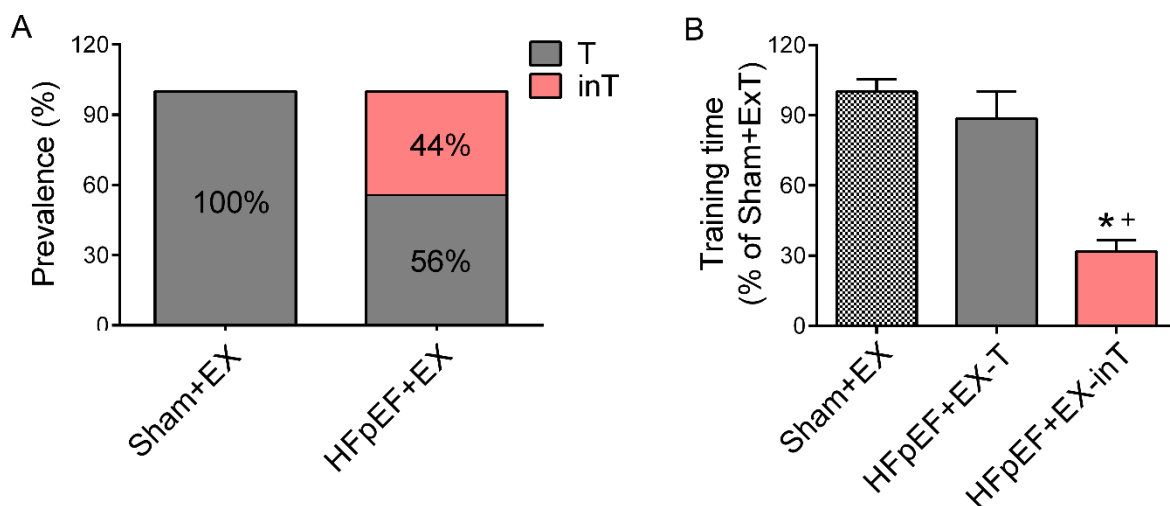


Figura 37. Incidencia de intolerancia al ejercicio en animales con HFpEF. (A) La prevalencia de animales intolerantes al ejercicio físico es del 44% en las ratas HFpEF. No se observaron animales intolerantes al ejercicio físico en el grupo Sham. (B) Tiempos de entrenamiento de los animales Sham y HFpEF. Los animales HFpEF intolerantes al ejercicio físico (HFpEF+EX-Int) muestran una reducción del 70% en el tiempo total de entrenamiento, la cual fue significativa en comparación a las ratas Sham+EX y HFpEF+EX-T. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+EX; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+EX-T. Sham+EX, $n = 6$; HFpEF+Sed, $n = 6$; HFpEF+EX-T, $n = 7$; HFpEF+EX-inT, $n = 5$ ratas.

8.16.- Parámetros fisiológicos basales en ratas con HFpEF tolerantes e HFpEF intolerantes al ejercicio físico.

Los parámetros fisiológicos basales y ecocardiográficos están descritos en las tablas 7 y 8, respectivamente. El ejercicio físico no modificó la hipertrofia cardíaca en los animales HFpEF tolerantes e intolerantes al ejercicio, medido por la razón HW/BW en comparación a los animales HFpEF+Sed (3.7 ± 0.3 vs. 4.4 ± 0.3 mg/g, HFpEF+Sed vs. HFpEF+EX-inT, respectivamente, Tabla 7). La SBP, DBP, PP y el HR no fueron significativamente diferentes entre todas las condiciones experimentales (Tabla 7). Similar a como se ha mostrado anteriormente, los animales HFpEF+Sed tienen un aumento significativo del LVEDD y del LVEDV comparado a los animales Sham+Sed. El entrenamiento por 6 semanas incrementó el LVESD en HFpEF+EX-T (4.1 ± 0.8 vs. 2.7 ± 0.1 mm, $p < 0.05$, HFpEF+EX-T vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Tabla 8) en comparación a los animales con HFpEF+Sed. No se observaron diferencias significativas en LVESD, LVEDD, LVESV, LVEDV, EF y el FS entre los animales HFpEF+EX-T vs. HFpEF+EX-inT (Tabla 8).

Tabla 7. Efecto de la intolerancia al ejercicio físico sobre parámetros fisiológicos basales

	Sham+Sed (n = 6)	Sham+EX (n = 6)	HFpEF+Sed (n = 6)	HFpEF+EX-T (n = 7)	HFpEF+EX-inT (n = 5)
Efectividad del entrenamiento					
Soleus/BW (% cambio)	100.0 ± 5.2	114.4 ± 1.5*	100.0 ± 6.7	118.1 ± 4.2*	111.0 ± 2.1
Hipertrofia cardíaca					
HW/BW (mg/g)	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.2	3.7 ± 0.3* ⁺	3.5 ± 0.2	4.4 ± 0.3* ⁺
Congestion pulmonar					
Lung W/D (g/g)	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.7 ± 0.3
BP y HR					
SBP (mmHg)	96.0 ± 3.8	88.1 ± 6.7	101.4 ± 5.3	108.9 ± 6.4	96.0 ± 6.2
DBP (mmHg)	66.7 ± 4.0	58.9 ± 3.9	63.3 ± 5.7	72.5 ± 6.0	57.1 ± 3.9
PP (mmHg)	29.3 ± 1.8	29.2 ± 3.0	38.1 ± 1.2	36.4 ± 2.2	35.3 ± 7.7
HR (latidos/min)	344.2 ± 11.9	361.0 ± 18.1	318.3 ± 16.2	359.0 ± 14.1	394.3 ± 21.2

Los valores están expresados como media ± error estándar de la media (S.E.M.). T: tolerante; inT: intolerante; HW/BW: peso del corazón/peso corporal; Lung W/D: Pulmón húmedo/seco] SBP: presión arterial sistólica; DBP: presión arterial diastólica; PP: presión de pulso; HR: frecuencia cardíaca. * Vs. Sham+Sed, + vs. Sham+ExT, p < 0.05.

Tabla 8. Efecto de la intolerancia al ejercicio físico sobre parámetros ecocardiográficos basales

	Sham+Sed		Sham+EX		HFpEF+Sed		HFpEF+EX-T		HFpEF+EX-inT	
	(n = 6)		(n = 6)		(n = 6)		(n = 7)		(n = 5)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
LVEDS (mm)	3.4 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.8 ± 0.4	3.2 ± 0.1	3.8 ± 0.2	4.7 ± 0.4 ^{*+}	3.3 ± 0.5	4.1 ± 0.8 ^{*+α}
LVEDD (mm)	6.8 ± 0.1	6.0 ± 0.2	5.6 ± 0.2	6.1 ± 0.2	7.0 ± 0.3	7.8 ± 0.4 ^{*+}	8.1 ± 0.2 ⁺	8.5 ± 0.4 ^{*+}	6.7 ± 1.1 ⁺	7.3 ± 1.2 ^{*+}
EF (%)	79.9 ± 3.6	85.3 ± 0.6	77.7 ± 4.1	77.7 ± 1.5	75.3 ± 4.4	87.2 ± 1.2	82.3 ± 1.5	73.3 ± 2.5	79.8 ± 2.8	73.5 ± 5.2
FS (%)	50.3 ± 3.7	55.4 ± 0.7	47.7 ± 3.6	47.3 ± 1.6	45.6 ± 3.9	58.7 ± 1.7	53.1 ± 1.8	44.6 ± 2.6	50.5 ± 3.1	45.1 ± 4.1

Los valores están expresados como media ± error estándar de la media (S.E.M.). LVEDD: volumen de fin de diástole del ventrículo izquierdo; ESD: volumen de fin de sístole; EF: fracción de eyección; FS: fracción de acortamiento. *, vs. Sham+Sed, +, vs. Sham+EX y α, vs. CHF+Sed, p<0.05.

8.17.- *Función cardíaca e intolerancia al ejercicio físico.*

Tomando en consideración que la condición de intolerancia al ejercicio físico es un signo clínico de HF, y se ha observado que en dependencia de la severidad de la HF la morfología del corazón puede cambiar, nos propusimos evaluar la función cardíaca con un tipo de análisis menos invasivo, que es independiente de la morfología cardíaca. Así, la función cardíaca fue evaluada por medio del análisis de “single beat” desde los registros de PV-loop (para más detalle ver métodos). Similar a la oclusión de la vena cava, los animales con HFpEF+Sed mostraron un deterioro de la función cardíaca diastólica tanto como también sistólica, en comparación a los animales Sham+Sed. Después de 6 semanas de entrenamiento, los animales HFpEF+EX-T no mostraron cambios significativos en la función cardíaca diastólica (V_0 : 254.2 ± 19.4 vs. 237.8 ± 6.6 μ l, HFpEF+EX-T vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 38 A, B) en comparación a animales HFpEF sedentarios. Sin embargo, los animales HFpEF+EX-T mostraron una mejora de la función cardíaca sistólica (ESPVR: 0.8 ± 0.1 vs. 0.5 ± 0.1 mmHg/ μ l, $p < 0.05$, HFpEF+EX-T vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 38 A, C) en comparación a animales HFpEF sedentarios. Por otro lado, los animales con HFpEF+EX-inT mostraron un deterioro significativo mayor de la función cardíaca diastólica (V_0 : 289.5 ± 21.3 vs. 237.8 ± 6.6 μ l, $p < 0.05$, HFpEF+EX-inT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 38A, B) en comparación a los animales HFpEF sedentarios. Además, no mostraron mejoras de la función cardíaca sistólica (ESPVR: $0.5 \pm$

0.1 vs. 0.5 ± 0.1 mmHg/ μ l, HFpEF+EX-inT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 38 A,

C) en comparación a los animales HFpEF sedentarios.

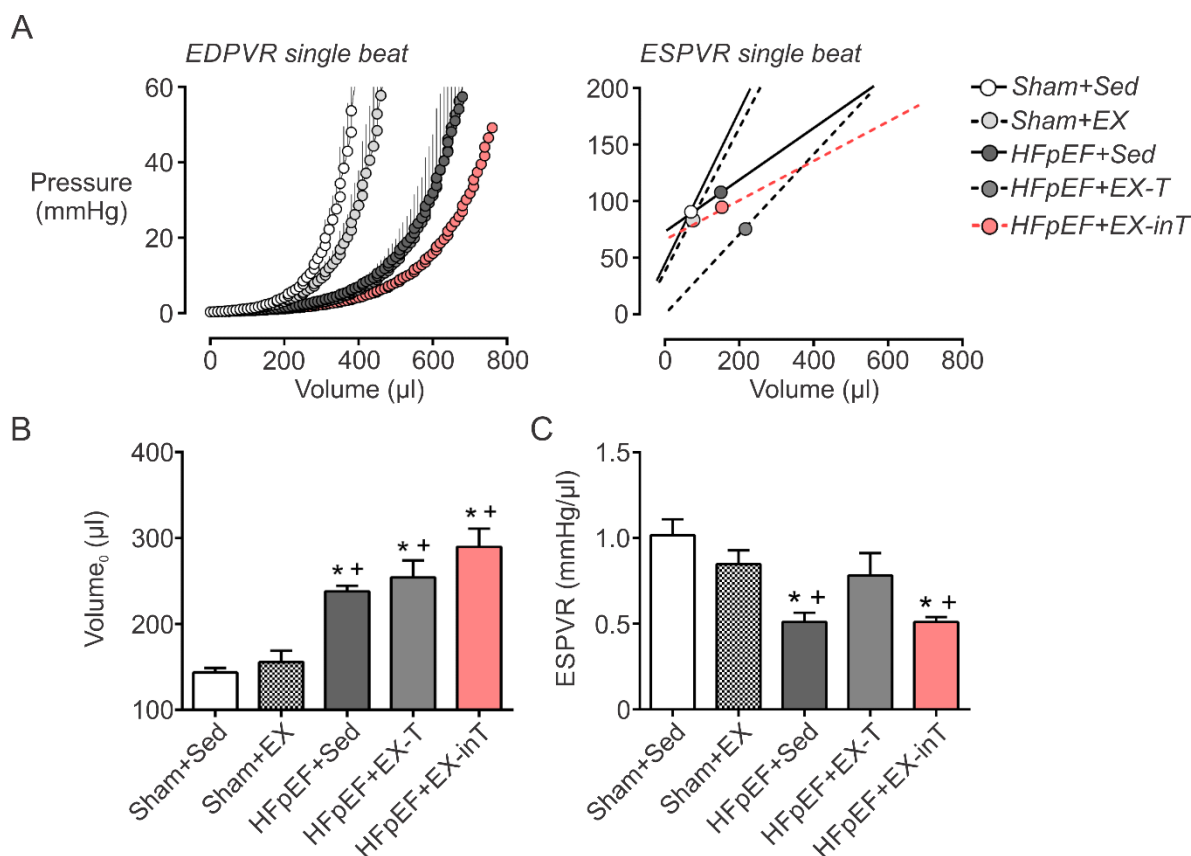


Figura 38. Efecto de la intolerancia al ejercicio físico sobre la función cardíaca en ratas con HFpEF. (A) (izquierda) relación presión-volumen de fin de diástole (EDPVR) y (derecha) relación presión-volumen de fin de sístole (ESPVR) por análisis de un solo ciclo cardíaco de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+EX-T), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+EX-T). (B) Efectos del ejercicio físico sobre el volumen a presión intraventricular 0. Los animales HFpEF+EX-Int presentan un mayor deterioro diastólico en comparación a los animales HFpEF+Sed. (C) Efectos del ejercicio físico sobre el ESPVR. El efecto beneficioso del ejercicio físico es disminuido en los animales HFpEF+EX-Int. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+EX; +, $p < 0.05$ vs. Sham+EX. Sham+EX, $n = 6$; HFpEF+Sed, $n = 6$; HFpEF+EX-T, $n = 7$; HFpEF+EX-inT, $n = 5$ ratas.

8.18.- Control simpático e incidencia de arritmias en ratas con HFpEF tolerantes/intolerantes al ejercicio físico.

El rol de la intolerancia al ejercicio físico sobre el control simpático cardíaco en los animales HFpEF, fue evaluado por medio de la respuesta cronotrópica a propranolol, un antagonista de receptores β adrenérgicos (1 mg/kg i.v.) (Figura 36). Los animales HFpEF intolerantes al ejercicio físico, mostraron aumentos similares del control simpático cardíaco comparado con lo observado en animales HFpEF+Sed (-92.4 ± 15.4 vs. -89.6 ± 13.4 Δ latidos/min, HFpEF+EX-inT vs. HFpEF+Sed, respectivamente, Figura 39 A, D).

Respecto a la incidencia de eventos arrítmicos, se observó que los animales intolerantes al entrenamiento no mostraron cambios significativos en el número de arritmias en comparación a los animales HFpEF+Sed teniendo ambos grupos una incidencia mayor de eventos arrítmicos en comparación con la condición Sham (Figura 39 B, C).

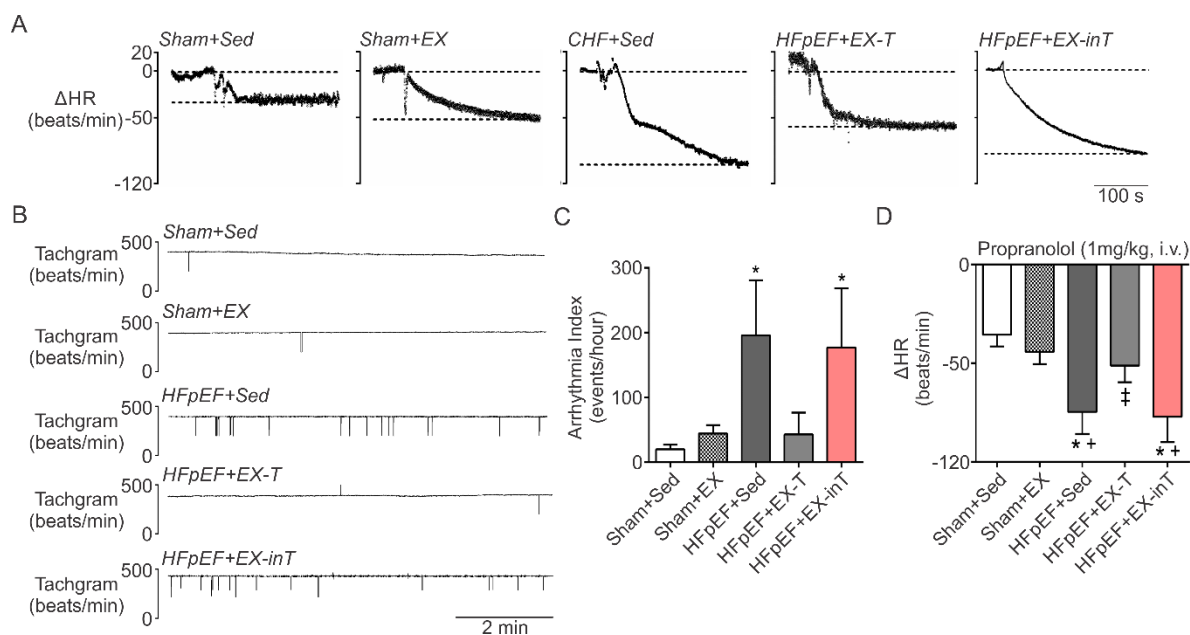


Figura 39. Efecto de la intolerancia al ejercicio físico sobre el control simpático y la incidencia de arritmias en ratas con HFpEF. (A) Registro representativo de la frecuencia cardíaca durante la administración de propranolol (1mg/kg i.v.) (Δ latidos/min) de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+ExT), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+ExT). Los animales HFpEF+EX-Int no mostraron una mejora de la respuesta bradicardica a propranolol. (B) tacograma representativo de la HR, donde se puede observar que los animales HFpEF intolerantes al ejercicio físico (HFpEF+EX-Int) no mejoran la incidencia de arritmias cardíacas. (C, D) Cuantificación de la incidencia de arritmias y la respuesta bradicardica a propranolol, respectivamente. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+Sed; +, $p < 0.05$ vs. Sham+EX; ‡, $p < 0.05$ vs. CHF+Sed. Sham+EX, $n = 6$; HFpEF+Sed, $n = 6$; HFpEF+EX-T, $n = 7$; HFpEF+EX-int, $n = 5$ ratas.

8.19.- Respuesta cardiovascular y simpática a la estimulación hipóxica e hipercapnia moderada en animales con HFpEF intolerantes al ejercicio.

Para determinar la respuesta cardiovascular a la hipoxia, durante el experimento de PV-loop se estimularon los quimiorreceptores periféricos con una mezcla gaseosa hipóxica (F_iO_2 10%, balanceado en N_2). Los animales HFpEF+EX-T incrementaron la R_f , sin mayores cambios en la presión intraventricular, un pequeño cambio en la potencia espectral del componente LF del HRV y sin mayores modificaciones del ECG (Figura 40 A, panel izquierdo). Por otro lado, los animales del grupo HFpEF+EX-inT durante la estimulación hipóxica mostraron un incremento mayor de la R_f , con un rápido descenso de la presión intraventricular. En efecto, se puede observar que el componente simpático se incrementa de manera notoria (LF del HRV), lo que desencadena la aparición de eventos arrítmicos (Figura 40 A, panel derecho) resultando en un descenso en la sobrevivencia de los animales HFpEF+EX-inT durante la estimulación hipóxica moderada (60% de sobrevivencia, $p < 0.05$) (Figura 40 B).

Por otro lado, durante la estimulación con hipercapnia moderada (F_iCO_2 7%), se observó que los animales HFpEF+EX-T y HFpEF+EX-inT mostraron un cambio similar en la frecuencia respiratoria en respuesta a la hipercapnia (Figura 41 A). Sin embargo, se observó que hay un mayor incremento del control simpático en los animales HFpEF+EX-inT en comparación a los animales HFpEF+EX-T (Figura 41 A, panel derecho). Por otro lado, durante la estimulación con hipercapnia, se puede observar que hay una mayor incidencia de eventos

arrítmicos por parte de los animales HFpEF+EX-inT (Figura 41 A, panel derecho), sin embargo, no se observaron eventos de mortalidad en las ratas HFpEF tolerantes he intolerantes al ejercicio físico (Figura 41B).

Los resultados sugieren que los animales con HFpEF presentan algún cambio en la respuesta ventilatoria a la hipoxia. Para determinar la función quimiorrefleja periférica en los animales tolerantes vs intolerantes con HFpEF, se evaluó la respuesta ventilatoria a la hipoxia aguda (HVR) en animal no anestesiado (F_{iO_2} 10%). En comparación a los animales Sham sedentarios, los animales HFpEF+Sed y HFpEF+EX-T no muestran cambios significativos en la HRV (Figura 42 A, B). Por el contrario, encontramos que los animales HFpEF+EX-inT mostraron una disminución significativa en la ganancia de la respuesta ventilatoria (V_E) a la hipoxia (Figura 42 A, B).

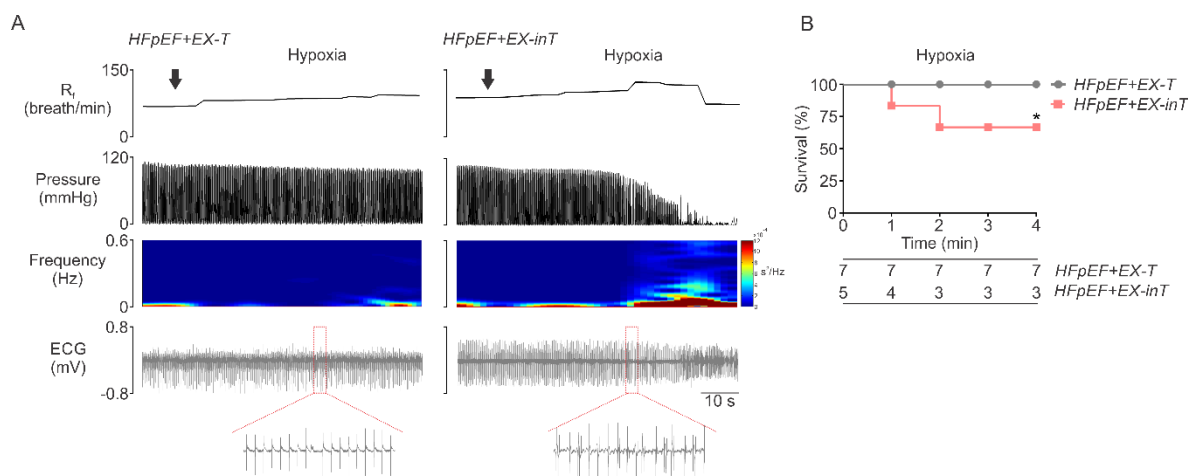


Figura 40. La estimulación hipóxica aguda moderada induce arritmogénesis letal en animales con HFpEF intolerantes al ejercicio físico. (A) Registro representativo de la frecuencia respiratoria (R_t), presión intraventricular, potencia espectral en el dominio continuo-variables de la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV) y electrocardiograma (ECG) de una rata HFpEF tolerante al ejercicio físico (HFpEF+EX-T) y un animal HFpEF intolerante al ejercicio físico (HFpEF+EX-Int). Durante la estimulación hipóxica moderada (F_iO_2 10%) los animales HFpEF+EX-Int presentan una mayor incidencia de arritmias y un aumento severo del componente simpático cardíaco (B) Las ratas HFpEF+EX-Int presentan un 40% de mortalidad durante la estimulación hipóxica. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. HFpEF+EX-T. HFpEF+EX-T, $n = 7$; HFpEF+EX-Int, $n = 5$ ratas.

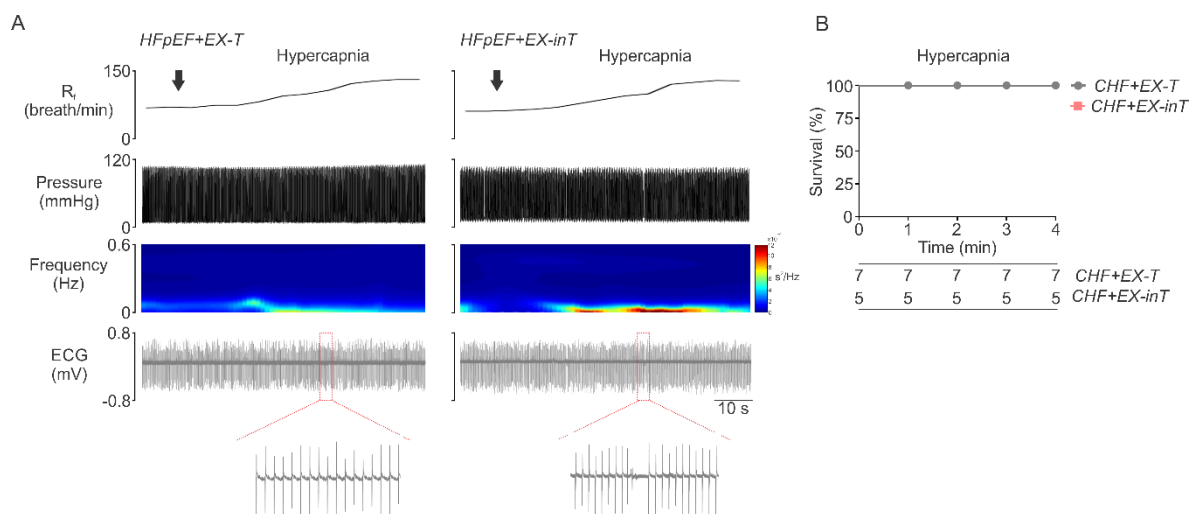


Figura 41. La estimulación aguda con hipercapnia induce arritmogénesis, sin eventos de mortalidad en animales con HFpEF intolerantes al ejercicio físico. (A) Registro representativo de la frecuencia respiratoria (R_f), presión intraventricular, potencia espectral en el dominio continuo-variables de la variabilidad del ritmo cardíaco (HRV) y electrocardiograma (ECG) de una rata HFpEF tolerante al ejercicio físico (HFpEF+EX-T) y un animal HFpEF intolerante al ejercicio físico (HFpEF+EX-Int). Durante la estimulación con hipercapnia ($F_i\text{CO}_2$ 7%) los animales HFpEF+EX-Int presentan una mayor incidencia de arritmias y un aumento severo del componente simpático cardíaco (B) Las ratas HFpEF+EX-Int y tolerantes no presentan eventos mortalidad durante la estimulación con hipercapnia. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. HFpEF+EX-T, $n=7$; HFpEF+EX-int, $n=5$ ratas.

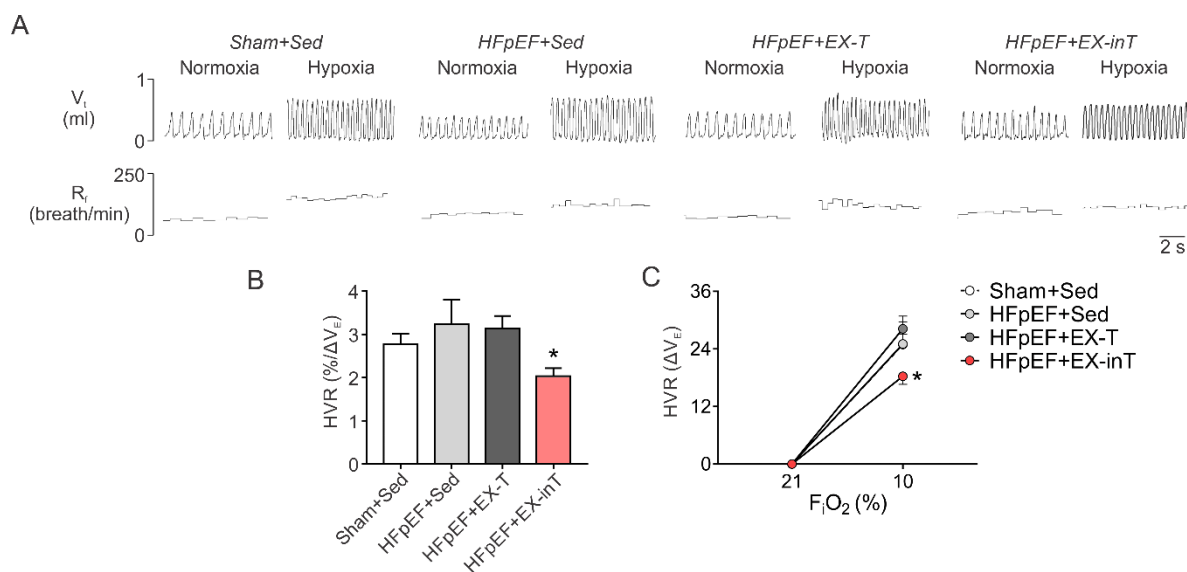


Figura 42. Las ratas con HFpEF intolerantes al ejercicio físico presentan un quimiorreflejo periférico disminuido. (A) Registro representativo del volumen corriente (V_t) y la frecuencia respiratoria (R_f) de una rata Sham sedentaria (HFpEF+Sed), una rata Sham sometida a ejercicio (Sham+ExT), una rata HFpEF sedentaria (HFpEF+Sed) y una rata HFpEF sometida a ejercicio físico (HFpEF+ExT), durante normoxia (F_iO_2 21%) e hipoxia (F_iO_2 10%). Los animales HFpEF+EX-Int muestran una disminución en la respuesta ventilatoria a la hipoxia (HVR) comparado a la condición HFpEF+EX-T. (B) Resumen de la ganancia de la HVR. Se puede observar que los animales HFpEF+EX-inT presentan una disminución en la HVR en comparación a los animales HFpEF+EX-T. (C) Resumen de datos de la diferencia entre F_iO_2 21 y 10 % en todas las condiciones experimentales. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. HFpEF+EX-T, $n = 4$.

8.20.- Rol de los quimiorreceptores periféricos en la tolerancia al ejercicio físico.

Los resultados anteriores sugieren que los quimiorreceptores periféricos estarían asociados a la tolerancia al ejercicio físico en ratas con HFpEF. Sin embargo, no está completamente claro si es que los CB son relevantes para la tolerancia al ejercicio físico en condiciones controles. Para determinar el rol de los quimiorreceptores periféricos en la tolerancia al ejercicio físico, procedimos a destruirlos quirúrgicamente y ver el impacto de la quimiodenevación sobre los tiempos de entrenamiento en animales controles sanos. Como se puede observar en la Figura 43, los animales a los que se les destruyó bilateralmente los cuerpos carotideos (CB), muestran un descenso significativo de la respuesta ventilatoria a la hipoxia respecto de la condición no desnervada. En efecto, los animales a los que se les realizó la ablación de los CB (CBA) a la primera y segunda semana de haber destruido los CB, tienen una respuesta menor en V_E a la hipoxia en comparación a condición control (49.50 ± 3.19 y 42.51 ± 3.18 vs. 101.61 ± 4.91 ml/min/100g, $p < 0.05$, CBA 1wk y CBA 2wk vs. Control, respectivamente, Figura 43 A, D). Además, los animales a los que se les destruyó los CB muestran un descenso en los tiempos de entrenamiento, lo cual puede deberse a que no responderían respiratoriamente al ejercicio (Figura 43). En efecto, se observó un descenso de ≈ 0.5 veces en el tiempo en el que se realiza una prueba de performance aeróbica, demostrando que la capacidad de ejercitar de animales controles dependería parcialmente de la integridad de los CB.

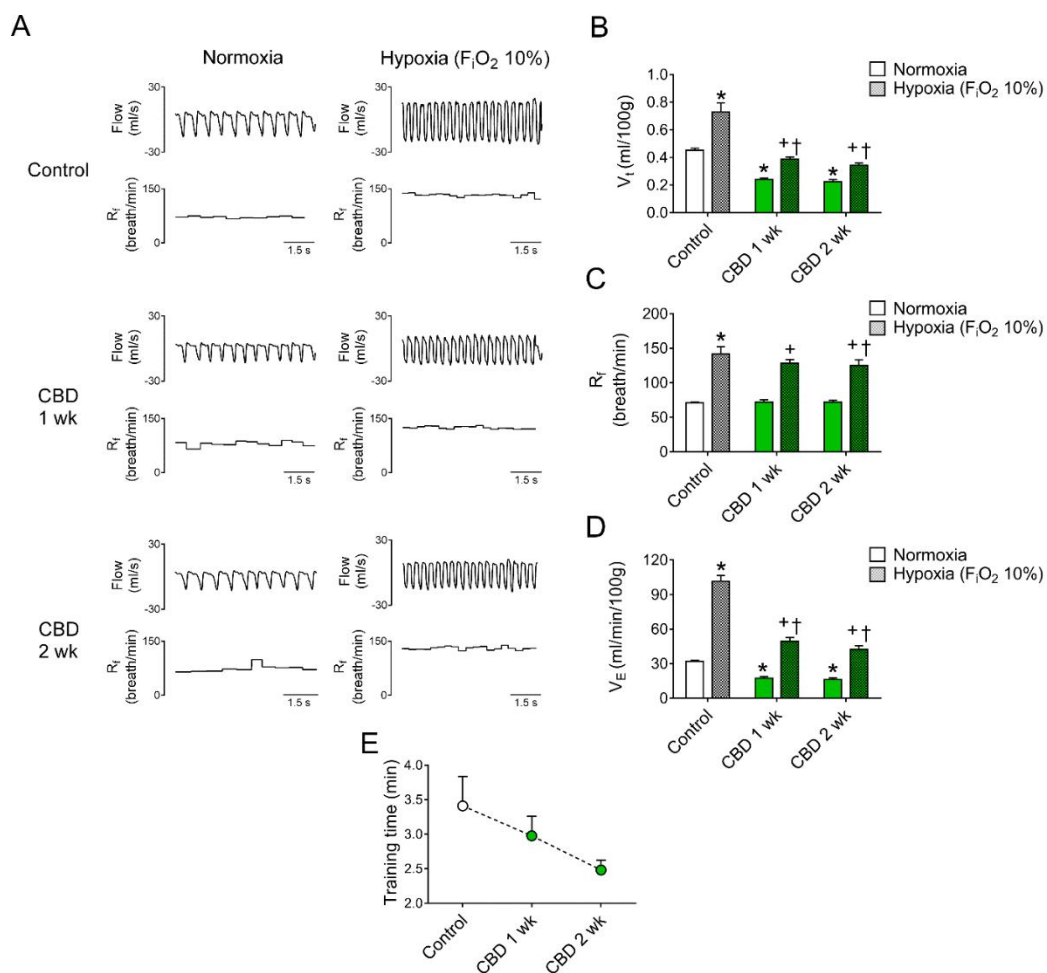


Figura 43. La tolerancia al ejercicio físico en animales controles depende de la integridad de los cuerpos carotídeos (CB). (A) Registro representativo del flujo respiratorio y la frecuencia respiratoria (R_f) de un animal por condición, durante normoxia (F_{iO_2} 21%) e hipoxia (F_{iO_2} 10%). Se puede observar que la respuesta ventilatoria a la hipoxia disminuye después de 1 y 2 semanas post ablación de los cuerpos carotídeos (CBA). (B, C, D) Cuantificación de la respuesta ventilatoria a la hipoxia en volumen corriente (V_t), R_f y volumen minuto (V_E). Se puede observar que la respuesta ventilatoria a la hipoxia disminuye después de la CBA (E) Cuantificación de la tolerancia al ejercicio físico en una prueba de capacidad aeróbica. Se puede observar que después de la CBA el tiempo hasta la fatiga disminuye. ANOVA de uno o dos factores, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Control Normoxia; +, $p < 0.05$ vs. CBA1+Normoxia; †, $p < 0.05$ vs. Control Hipoxia, $n = 4$.

8.21.- Rol de los quimiorreceptores periféricos en la tolerancia/intolerancia al ejercicio físico en animales con HFpEF.

Para determinar la contribución de los CBs en la tolerancia/intolerancia al ejercicio físico, estos fueron removidos quirúrgicamente. La ablación de los CBs disminuyó la respuesta ventilatoria a la hipoxia en los animales HFpEF tolerantes al ejercicio físico (33.02 ± 3.6 vs. 50.26 ± 1.4 ml/min/100g, $p < 0.05$, HFpEF+EX-T+CBA vs. HFpEF+EX-T, respectivamente) (Figura 44 A y B). Respecto de los tiempos de entrenamiento de los animales HFpEF+EX-T que fueron denervados, encontramos que estos mostraban una disminución significativa en los tiempos de entrenamiento en comparación a los animales HFpEF+EX-T sin denervación carotídea (50.5 ± 9.7 vs. 88.6 ± 11.6 % de cambio, $p < 0.05$, HFpEF+EX-T+CBA vs. HFpEF+EX-T, respectivamente, Figura 45).

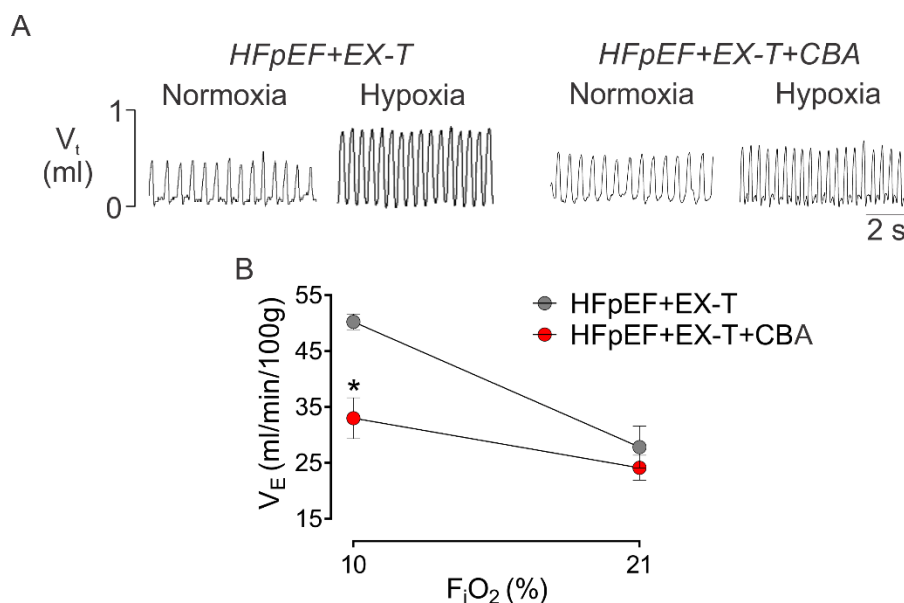


Figura 44. Efectividad de la ablación de los cuerpos carotideos en las ratas con HFpEF tolerantes al ejercicio físico. (A) Registro representativo del volumen corriente (V_t) de una rata HFpEF tolerante al ejercicio físico (HFpEF+ET-T) y una rata tolerante al ejercicio físico, después de la ablación selectiva de sus cuerpos carotideos (HFpEF+ET-T+CBA), durante normoxia (F_iO_2 21%) y durante una estimulación con hipoxia (F_iO_2 10%). (B) resumen de datos de la respuesta ventilatoria a la hipoxia en los animales HFpEF+EX-T y HFpEF+ET-T+CBA. Los animales HFpEF tolerantes al ejercicio físico (HFpEF+EX-T) a los cuales se les denervó los cuerpos carotideos (HFpEF+EX-T+CBA) muestran una disminución significativa de la respuesta ventilatoria a la hipoxia (HVR). ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. HFpEF+EX-T hypoxia (F_iO_2 10%), $n = 4$.

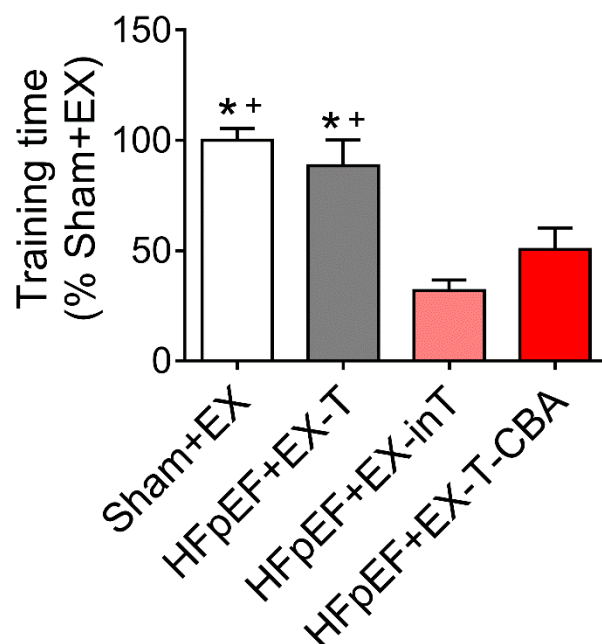


Figura 45. La tolerancia al ejercicio físico de las ratas HFpEF tolerantes al ejercicio físico (HFpEF+EX-T) depende de la integridad de los cuerpos carotídeos. (A) Cuantificación de los tiempos de entrenamiento de las ratas Sham sometidas a ejercicio físico (Sham+EX), ratas HFpEF tolerantes al ejercicio físico (HFpEF+ET-T), ratas HFpEF intolerantes al ejercicio físico (HFpEF+EXinT) y ratas tolerantes al ejercicio físico, después de la ablación selectiva de sus cuerpos carotídeos (HFpEF+ET-T+CBA). Se puede observar que los animales HFpEF intolerantes al ejercicio físico (HFpEF+EX-inT) presentan una disminución en los tiempos de ejercicio físico y después de la ablación de los cuerpos carotídeos (CBA) los animales HFpEF tolerantes al ejercicio físico (HFpEF+EX-T-CBA) disminuyen su capacidad de ejercitarse. ANOVA de uno, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. HFpEF+EX-inT; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+EX-T-CBA. $n = 4$.

8.22.- La ablación selectiva de los CB es deletéreo para las adaptaciones cardíacas al ejercicio en ratas HFpEF.

La ablación de los CB no generó cambios significativos de la función cardíaca diastólica (Figura 46 A, B). Sin embargo, en comparación a los animales HFpEF+EX-T, que tenían los CB intactos, la ablación selectiva de los CBs (HFpEF+EX-T+CBA) produjo un deterioro significativo de la contractibilidad cardíaca (0.3 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1 mmHg/ μ l, $p < 0.05$, HFpEF+EX-T+CBA vs. HFpEF+EX-T, respectivamente, Figura 46 A, C).

En ratas HFpEF+EX-T+CBA encontramos que la ablación incrementó significativamente el tono simpático en comparación a los animales tolerantes no denervados (-61.3 ± 10.1 vs. -94.4 ± 12.3 Δ HR, HFpEF+EX-T vs. HFpEF+EX-T+CBA, respectivamente, Figura 47 A, B). Respecto a la incidencia de eventos arrítmicos, la denervación de los CB no modificó significativamente la incidencia de arrítmicas en los animales HFpEF+EX-T (Figura 47 C, D).

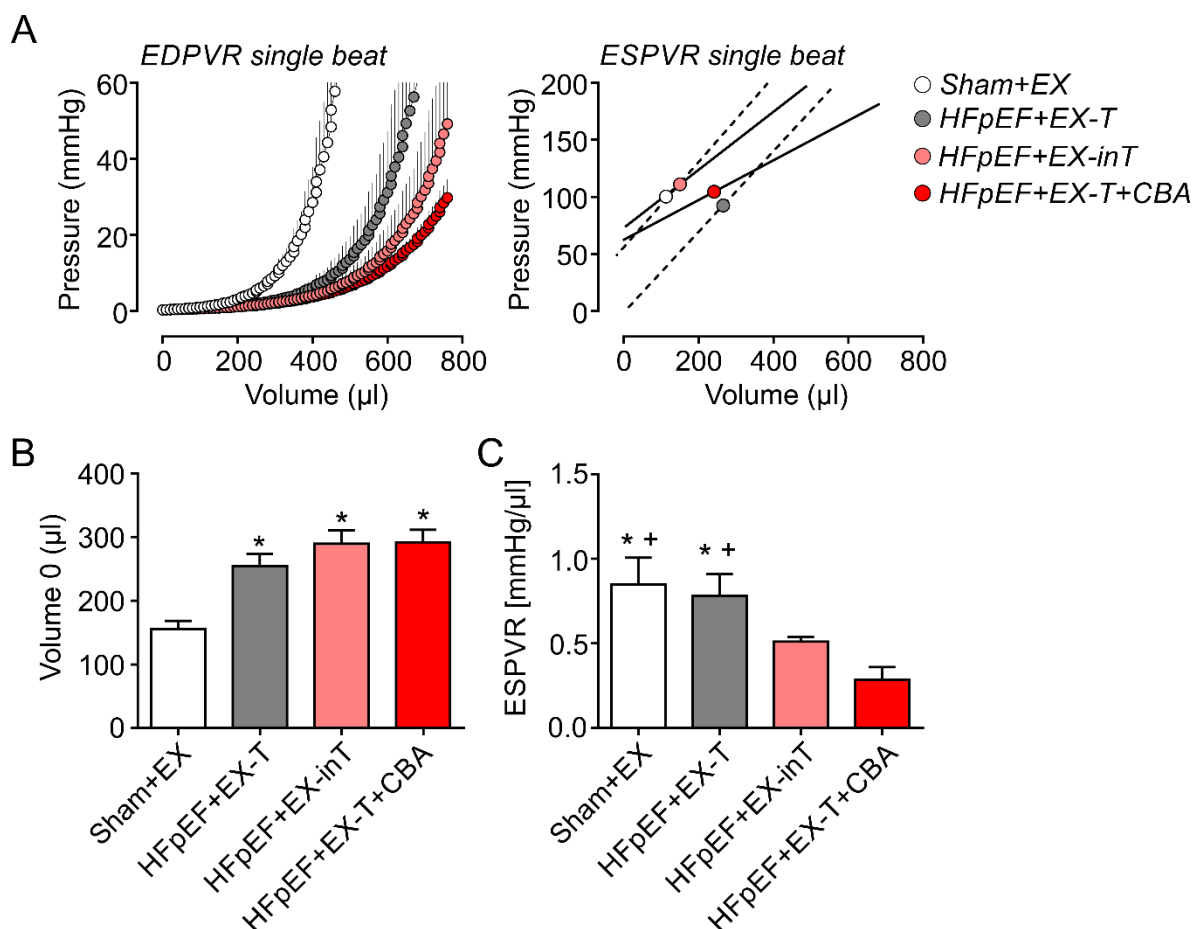


Figura 46. Efecto de la ablación de los cuerpos carotídeos (CBA) sobre la función cardíaca en ratas con HFpEF tolerantes al ejercicio físico. (A) (izquierda) relación presión-volumen de fin de diástole (EDPVR) y (derecha) relación presión-volumen de fin de sístole (ESPVR) por análisis de un solo ciclo cardíaco de una rata Sham sometida a ejercicio físico (Sham+EX) una rata HFpEF tolerante al ejercicio físico (HFpEF+ET-T), una rata HFpEF intolerante al ejercicio físico (HFpEF+EXinT) y una rata tolerante al ejercicio físico, después de la ablación selectiva de sus cuerpos carotídeos (HFpEF+ET-T+CBA). (B) Efectos del ejercicio físico sobre el volumen a presión intraventricular 0 sobre animales HFpEF tolerantes (HFpEF+EX-T), intolerantes (HFpEF+EX-Int) y HFpEF tolerantes después de la ablación de los CB (HFpEF+EX-T+CBA). Los animales HFpEF+EX-T y HFpEF+EX-Int presentan un deterioro de la función cardíaca diastólica. La ablación de los CB no modifica el volumen a presión 0 en las ratas HFpEF+EX-T. (C) Efectos del ejercicio físico sobre el ESPVR en animales HFpEF+EX-T, HFpEF+EX-Int y HFpEF+EX-T+CBA. Las ratas HFpEF+EX-inT muestran un deterioro de la función cardíaca sistólica en comparación a los animales

Sham+EX y HFpEF+EX-T. La ablación de los CB deteriora la función cardíaca sistólica en las ratas HFpEF+EX-T. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. HFpEF+EX-inT y Sham+EX; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+EX-T+CBA. Sham+EX, n= 6; HFpEF+EX-T, n= 7; HFpEF+EX-inT, n= 5; HFpEF+EX-T+CBA, n= 4.

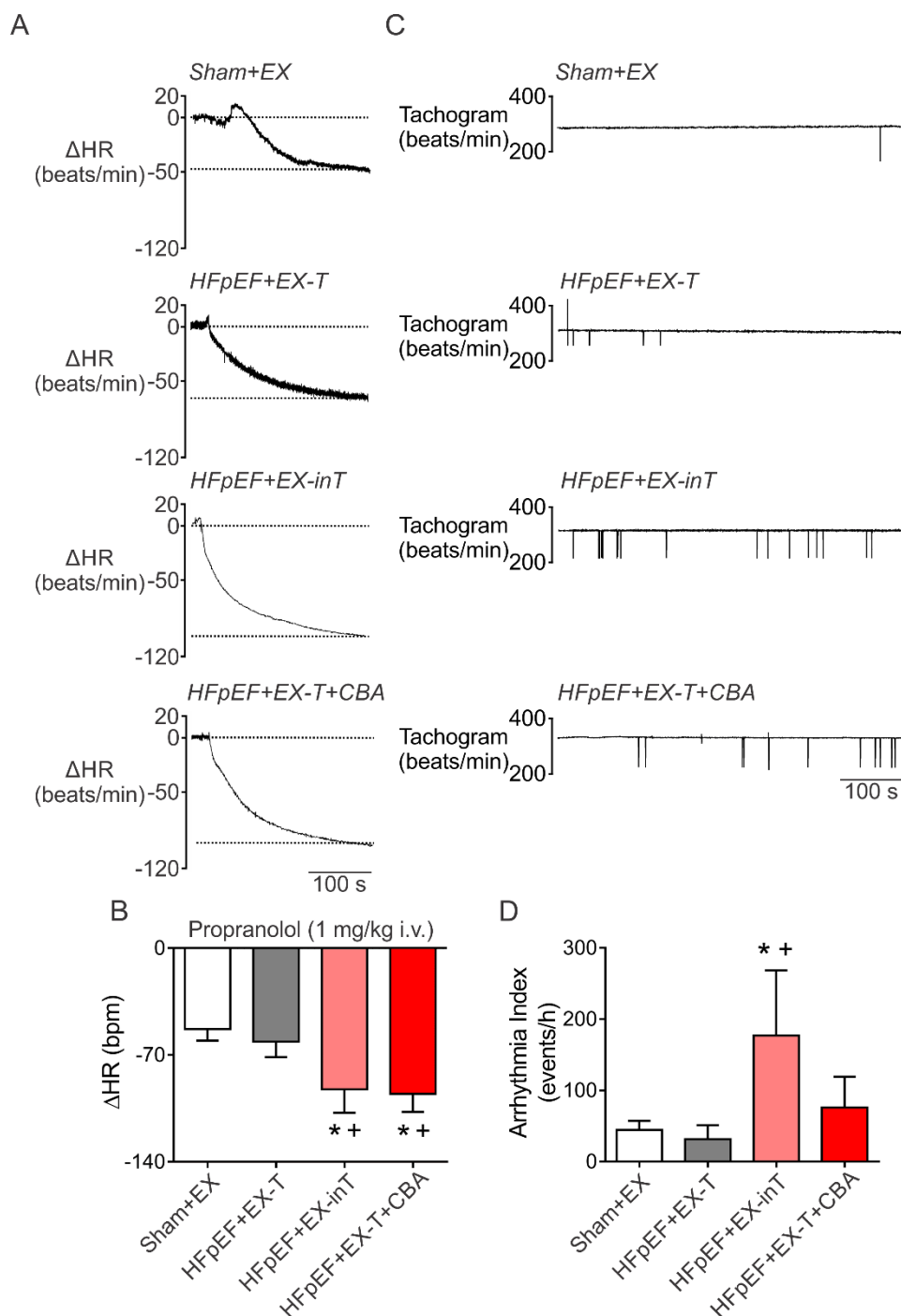


Figura 47. Efecto de la ablación de los cuerpos carotídeos (CB) sobre el control simpático cardíaco y la incidencia de arritmias en ratas HFpEF tolerantes al ejercicio físico. (A) Registro representativo de la frecuencia cardíaca durante la administración de propranolol (Δ HR) de un animal por condición. La ablación selectiva de los CB en las ratas HFpEF tolerantes al ejercicio físico (HFpEF+EX-T+CBA), incrementa la respuesta bradicárdica a

propranolol. (B) Cuantificación de la respuesta bradicardica a propranolol en las condiciones experimentales. (C) Registro representativo de la HR, donde se puede observar que la CBA no modifica mayormente la incidencia de arritmias en los animales HFpEF+EX-T. (D) Cuantificación de la incidencia de arritmias. ANOVA de un factor, seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak. *, $p < 0.05$ vs. Sham+EX; +, $p < 0.05$ vs. HFpEF+EX-T. Sham+EX, n= 6; HFpEF+EX-T, n= 7; HFpEF+EX-inT, n= 5; HFpEF+EX-T+CBA, n= 4.

9.- DISCUSION

Los principales hallazgos de esta tesis doctoral son: i) ratas con HFpEF presentan un deterioro tanto de la función cardíaca diastólica como sistólica, hipertrofia cardíaca, remodelamiento adverso cardíaco, quimiorreflejo central hipercápnico exacerbado, sin modificaciones significativas del quimiorreflejo periférico hipóxico, aumento en el nivel de estrés oxidativo y actividad crónica de las neuronas pre-simpáticas de la RVLM, desbalance autonómico cardíaco y mayor incidencia de eventos arrítmicos; ii) la activación aguda de los quimiorreceptores centrales induce un aumento mayor de la actividad simpática, un mayor deterioro de la función cardíaca diastólica y una mayor incidencia de arritmias; iii) las alteraciones autonómicas y cardiovasculares presentes en HFpEF son dependientes de la integridad de las neuronas C1 de la RVLM; iv) el deterioro de la función cardíaca y el aumento del control simpático inducido por un estímulo hipercápnico en animales con HFpEF son dependientes de integridad de las neuronas de la RVLM; v) un programa de ejercicios físico, en ratas con HFpEF tolerantes al ejercicio disminuye la progresión del deterioro cardíaco, mejora la función cardíaca sistólica, mejora el balance autonómico cardíaco y la incidencia de eventos arrítmicos y disminuye el estrés oxidativo en la RVLM; vi) ratas con HFpEF que presentan intolerancia al ejercicio físico, no muestran mejoras en la incidencia de eventos arrítmicos ni en el balance autonómico, y muestran un deterioro mayor de la función cardíaca diastólica; vii) los animales HFpEF intolerantes al ejercicio físico

muestran una disminución en la respuesta ventilatoria a hipoxia, y la exposición a niveles de hipoxia moderada produce una respuesta simpática exagerada gatillando arritmias letales; viii) la ablación de los CB en animales controles y con HFpEF tolerantes al ejercicio disminuye la performance aeróbica; ix) la ablación de los CB en los animales HFpEF tolerantes al ejercicio físico revierte las adaptaciones positivas asociadas al ejercicio físico, siendo el resultado final un cambio del fenotipo tolerante al intolerante.

9.1. Las ratas con HFpEF muestran hipertrofia cardíaca y deterioro de la función cardíaca sistólica y diastólica.

La HFpEF se caracteriza por un deterioro de la función cardíaca diastólica como también sistólica (Ya y cols. 2002). Adicionalmente, se ha descrito que en HFpEF la hipertrofia cardíaca y el remodelamiento cardíaco contribuyen significativamente al deterioro de la función cardíaca (Mosterd y Hoes 2007). En la presente tesis se observó que los animales HFpEF presentan un deterioro de la función cardíaca diastólica y sistólica, hipertrofia cardíaca y mayor acumulación de colágeno en el ventrículo izquierdo. La degradación y síntesis de colágeno está determinada por la expresión y/o actividad de las MMPs y TIMPs, respectivamente (Spinale y Villareal 2014). Nuestros resultados muestran que existe mayor deposición de colágeno en el LV, sin embargo, y paradójicamente, se observó un aumento de la MMP2 y una disminución de la TIMP-2. Estos resultados sugieren que la matriz extracelular, la cual se sabe es dinámica, estaría en un proceso de regulación de los

componentes fibróticos (Spinale y Villareal 2014). Además, observamos que la presión de fin de diástole (LVEDP) (indicador de la severidad de la HF) está aumentada en los animales HFpEF, sin cambios significativos en la EF y el FS, resultado que indica que estos animales sufren de una insuficiencia cardíaca con un deterioro mayoritariamente de tipo diastólico. En su conjunto, estos resultados validan el modelo utilizado en la presente tesis como un modelo de HFpEF, ya que recapitula la mayoría de los criterios clínicos para el diagnóstico de la patología (Yancy y cols. 2013). Sin embargo, una de las limitantes de este modelo experimental es que no presenta las comorbilidades asociadas a la HFpEF, como son hipertensión, obesidad, entre otras (Yancy y cols. 2013).

9.2. Las ratas con HFpEF presentan desbalance autonómico, mayor estrés oxidativo y activación crónica de la RVLM.

Se ha propuesto que el desbalance autonómico es un indicador de severidad de la insuficiencia cardíaca (reducida o preservada), lo cual ha sido fuertemente asociado a la progresión de la patología (Kitzman y cols., 2002; Florea & Cohn, 2014). En efecto, se ha observado que en insuficiencia cardíaca con fracción eyectada reducida (HFrEF), el aumento de la actividad simpática está correlacionada positivamente con la incidencia de eventos de mortalidad (Del Rio y cols. 2013). Similar a la evidencia existente en humanos, la presente investigación muestra que los animales con HFpEF, presentan un desbalance autonómico con predominancia simpática. Más aún, se observó que el componente de baja frecuencia del

HRV esta aumentado, como también se mostró una mayor respuesta bradicardica a propranolol (antagonista de receptores β), en comparación a los animales Sham. Existen diferentes núcleos que controlan la actividad simpática, sin embargo, se ha propuesto que la RVLM es una de las principales zonas en el tronco encéfalo asociadas al control simpático, más aún, se ha propuesto que representa aproximadamente el 80% de la salida simpática cardíaca (Guyenet 2017). Tomando en consideración que en HFrEF existe una hiperactivación de la RVLM (Del Rio y cols. 2013), nos propusimos determinar el nivel de activación de este núcleo en ratas con HFpEF. Nuestros resultados muestran que en HFpEF la RVLM está crónicamente activa, lo cual ocurre en tándem con el aumento en la actividad simpática. En efecto, existe una mayor expresión de Fos-b, un indicador de actividad crónica neuronal (sobrexpresión por sobre 10 días) (Vialou y col. 2015; Del Rio y col. 2013), en la RVLM de los animales HFpEF. Adicionalmente, se observó que este aumento en la actividad crónica de las neuronas de la RVLM ocurre junto con un aumento en el nivel de estrés oxidativo, lo cual ha mostrado ser uno de los principales estímulos para la activación crónica de la RVLM (Lindley y cols., 2004; Ding y cols., 2009).

9.3. La activación aguda del quimiorreflejo central empeora el balance autonómico, la función cardíaca y la arritmogénesis cardíaca en animales con HFpEF.

En otros modelos de HF (modelo de infarto, HFrEF), la activación de la RVLM depende estrechamente de la integridad de los quimiorreceptores periféricos (Del Rio y cols. 2013).

Sin embargo, nuestros resultados en ratas con HFpEF muestran que el quimiorreflejo central (respuesta ventilatoria a la hipercapnia) y no el periférico (respuesta ventilatoria a la hipoxia), estarían potenciado. Más aún, la activación aguda con hipercapnia induce un aumento mayor del tono simpático cardíaco, una mayor incidencia de eventos arrítmicos y un deterioro más severo de la función cardíaca diastólica. El deterioro en la función cardíaca, así como la arritmogénesis producto de la estimulación de los quimiorreceptores centrales estarían mediados por el aumento del tono simpático en respuesta a la estimulación de los quimiorreceptores ya que la administración de propranolol previno los efectos deletéreos de la activación de quimiorreceptores centrales. En resumen, estos resultados sugieren que la activación de la RVLM podría depender parcialmente de la activación de los quimiorreceptores centrales y no de los quimiorreceptores periféricos, sin embargo, nuestros datos no descartan la participación de los CB ni tampoco descartan la disminución de la ganancia del barorreflejo cardíaco, el cual está disminuido en los animales con HFpEF, sobre la activación de la RVLM en los animales HFpEF.

Se ha visto que las neuronas de la RVLM reciben modulación sináptica por parte de los quimiorreceptores periféricos y centrales, más específicamente, se ha mostrado que las neuronas quimiorreceptoras centrales podrían modular la actividad simpática cardíaca (Moreira y cols., 2006; Guyenet y cols., 2010; Del Rio y cols. 2013). Los principales quimiorreceptores centrales se encuentran ubicados en la zona del RTN (Guyenet y cols.

2010) y se sabe que estas neuronas quimiorreceptoras centrales hacen sinapsis directas en la RVLM (Rosin y cols. 2003). Por lo tanto, es posible que neuronas del RTN modulen la actividad de neuronas de la RVLM. Más aún, se ha mostrado que la activación de los quimiorreceptores centrales con hipercapnia produce una sincronización entre la ventilación y la actividad simpática, generando acoplamiento respiratorio-simpático (Narkiewicz y cols., 1999; Lazarenko y cols., 2009). Esta evidencia es consistente con nuestros resultados, ya que luego de estimular con hipercapnia se observó un aumento importante (notorio) de la salida simpática cardíaca.

Una mayor incidencia de eventos arrítmicos ha sido asociada a un incremento de la mortalidad (Esler 1998; Giannoni y cols., 2008). Se ha mostrado que en ratas con HFrEF, la incidencia de arritmias cardíacas dependería de la hiperactivación de los CB (Del Rio y cols. 2013). Sin embargo, las ratas con HFpEF mostraron un aumento del quimiorreflejo central y más importante aún, la activación aguda con hipercapnia induce un aumento severo en la incidencia de eventos arrítmicos. Tomando en consideración que los eventos arrítmicos dependerían parcialmente del aumento del control simpático y que las neuronas de la RVLM reciben sinapsis directas desde las neuronas quimiorreceptoras del RTN (Moreira y cols., 2006; Rosin y cols., 2006; Abbott y cols., 2013), es posible proponer que la activación aguda de las neuronas del RTN con hipercapnia activarían las neuronas del RVLM, aumentando la salida simpática y la arritmogénesis cardíaca.

9.4. La destrucción selectiva del RVLM restablece el balance autonómico en animales con HFpEF

A pesar de que nuestros resultados muestran que la RVLM sería relevante en la fisiopatología de la HFpEF, hasta ahora no existían estudios que demostraran una relación causal entre las neuronas pre-simpáticas de la RVLM y la progresión de la HFpEF. Por lo tanto, nos propusimos destruir selectivamente esta población de neuronas en ratas con HFpEF y determinar los efectos de la eliminación de estas neuronas sobre la progresión de la HFpEF. Encontramos que la eliminación de ~70% de las neuronas pre-simpáticas de la RVLM en ratas con HFpEF, reduce el componente simpático de HRV, mejora el BRS cardíaco, reduce la incidencia de eventos arrítmicos y mejora la función cardíaca. Más aún, se observó que la disminución progresiva de la fracción de acortamiento (FS) en los animales HFpEF, fue mejorada después del tratamiento con la toxina D β H-SAP, sugiriendo fuertemente que la RVLM tiene un rol fundamental en la progresión de la HFpEF. Considerando que ~80% de toda la actividad simpática cardíaca es dependiente de las neuronas de la RVLM (Guyenet y cols. 2010) y que previamente observamos que el empeoramiento de la función cardíaca diastólica y la incidencia de eventos arrítmicos serían dependientes del simpático, no es extraño de observar que estas variables mejoren después de haber destruido masivamente esta zona del tronco encéfalo. Sin embargo, y a pesar de que nuestros resultados serían relevantes en la fisiopatología de la HFpEF, existen otras zonas en el cerebro asociadas al

control simpático que también podrían contribuir a la simpatoexcitación que se observa en HF (Toledo y cols. 2017). Así, el núcleo paraventricular (PVN) ha mostrado ser relevante en el aumento del componente simpático cardíaco (Pyner 2014; Shenton y Pyner 2016). En efecto, se ha observado que en HF existe un aumento de la actividad del PVN a la RVLM, lo cual contribuiría al aumento del control simpático (Toledo y cols. 2017). Sin embargo, también sugiere que la RVLM, podría ser un centro integrador de toda la actividad simpática originada en el hipotálamo y en el tronco encéfalo.

9.5. El deterioro de la función cardíaca y la mayor incidencia de arritmias en los animales con HFpEF disminuyen al eliminar neuronas catecolaminérgicas de la RVLM.

Como se mostró previamente, existe un aumento en la incidencia de eventos arrítmicos en HF (Esler, 1998; Giannoni y cols., 2008). Nosotros encontramos que la eliminación selectiva de las neuronas pre-simpáticas de la RVLM disminuye significativamente la incidencia de arritmias cardíacas. Además, en ratas con HFpEF el remodelamiento de la matriz colágena del corazón no se relacionaría con el aumento de la actividad simpática ya que la eliminación de neuronas C1 de la RVLM no modifica las deposiciones de colágeno en el ventrículo izquierdo ni la hipertrofia cardíaca, lo cual sugiere fuertemente que la mejora en las arritmias cardíaca en HFpEF, serían dependientes del aumento en el tono simpático hacia el corazón.

Similar a lo que ocurre en los pacientes con HFpEF (Yu y cols. 2002), mostramos que las ratas HFpEF presentan un deterioro tanto de la función cardíaca diastólica como sistólica.

Además, observamos que la estimulación aguda con hipercapnia exacerba el deterioro de la función cardíaca diastólica, pero no así la función cardíaca sistólica. Las neuronas del RTN responden a la acidificación del líquido cefalorraquídeo, secundario a un aumento en la $p\text{CO}_2$ (Guyenet y cols. 2010). Existe evidencia que muestra que la activación de los quimiorreceptores centrales con hipercapnia exacerba el control autonómico simpático (Guyenet y cols. 2010). En efecto, se ha demostrado que en condiciones no patológicas la estimulación con hipercapnia induce un aumento del control simpático en humanos (Somers y cols. 1989), gatos (Millhorn 1986) y ratas (Oikawa y cols. 2005). Además, se ha mostrado que en ratas con HFpEF la actividad del nervio simpático renal incrementa luego de la estimulación con hipercapnia (Kristen y cols. 2002). Nuestros resultados amplían la evidencia existente y más aún, demostramos que las neuronas de la RVLM son necesarias para producir los efectos adversos de la estimulación con hipercapnia sobre el balance autonómico y la función cardíaca en HFpEF. Estos resultados sugieren que existiría una comunicación no solo anatómica, si no, funcional entre las neuronas quimiorreceptoras del RTN con las neuronas de la RVLM (Rosin y cols. 2003). Sin embargo, esta hipótesis aún no ha sido comprobada (electrofisiología), por lo tanto, futuras investigaciones deberán dilucidar si esta conexión anatómica RTN-RVLM es verdaderamente funcional.

9.6. Rol del ejercicio físico sobre la función cardíaca y el control autonómico en ratas con HFpEF.

Nuestros resultados demuestran que el deterioro del control autonómico cardíaco es relevante dentro de la fisiopatología de la HFpEF. Por lo tanto, determinamos si es que el ejercicio físico, como una terapia no farmacológica, podría impactar positivamente en el control autonómico y la función cardíaca en animales con HFpEF. La evidencia previa sobre los efectos del ejercicio físico sobre la función cardíaca en HFpEF es controversial. En efecto, se han mostrado solo mejoras discretas de la función cardíaca diastólica en pacientes con HFpEF (Deber y cols. 2015), mientras que otros investigadores proponen que el ejercicio físico de tipo endurance-resistencia no tendría efectos beneficiosos sobre la función cardíaca diastólica (Pandey y cols. 2015). Acorde a estos resultados, nuestros datos muestran que la función cardíaca diastólica no mejora después de 6 semanas de ejercicio físico en ratas con HFpEF. Sin embargo, encontramos que el ejercicio físico si mejora la función cardíaca sistólica, asociada a la contractibilidad del corazón. Contrario a nuestros hallazgos, Smart y cols. (2007), mostró que después de un entrenamiento de tipo endurance/resistencia la función cardíaca sistólica mejoró solo parcialmente en 18 pacientes con HFpEF. Estas diferencias respecto de nuestros resultados podrían deberse al grado de desbalance autonómico de estos pacientes y las múltiples comorbilidades asociadas a la HFpEF, los cuales podrían contribuir significativamente a enmascarar los efectos beneficiosos del ejercicio físico en estos pacientes (Paulus y cols. 2013).

Por otra parte, las ratas con HFpEF presentan desbalance autonómico, caracterizado por un aumento del control simpático y una disminución significativa del control parasimpático, lo cual es similar a lo que se ha demostrado en pacientes con HFpEF (Kitzman y cols., 2002; Florea & Cohn, 2014). Además, nuestros datos muestran que las ratas con HFpEF presentan un control barorreflejo cardíaco disminuido. Estos resultados son similares a los que han encontrado otros investigadores (Niebauer y cols. 1985), donde perros con HFpEF, inducido por una fistula arteriovenosa, presentan una disminución significativa del control barorreflejo cardíaco, comparado a animales controles (Niebauer y cols. 1985). De manera importante, nuestros datos muestran que el ejercicio físico mejora el control autonómico cardíaco. Estos resultados son similares a los encontrados en pacientes con HFpEF, donde se ha mostrado que el ejercicio físico mejora las alteraciones del HRV (Murad y cols. 2012). Adicionalmente, demostramos que el ejercicio físico restablece el BRS en ratas con HFpEF. Este resultado es relevante, ya que se ha propuesto que la disminución del BRS estaría estrechamente relacionada con la incidencia de eventos de mortalidad (Schwartz y cols. 2015). En efecto, pacientes con HF que presentan <3 mmHg/ms de ganancia del BRS muestran una disminución en la sobrevivencia respecto de los pacientes con >3 mmHg/ms (Schwartz y cols. 2015). Nuestros datos muestran que nuestro modelo experimental de HFpEF presenta una ganancia del BRS de 1.35 ± 0.27 mmHg/ms y el ejercicio físico lo incrementa a 4.28 ± 0.91 mmHg/ms. Por lo tanto, se puede evidenciar que en ratas con

HFpEF, el ejercicio físico modifica el BRS a una ventana de bajo riesgo de mortalidad, sugiriendo que el ejercicio físico en HFpEF podría mejorar la supervivencia. A pesar de que estos resultados serían relevantes dentro de la fisiopatología de la HFpEF, es necesario confirmarlos en estudios clínicos con pacientes con HFpEF.

9.7. Efecto del ejercicio físico sobre estrés oxidativo y la expresión de enzimas pro y anti-oxidantes a nivel de la RVLM en ratas con HFpEF.

Las neuronas de la RVLM son importantes en la progresión de la HFpEF. En efecto, también demostramos que esta zona presenta un aumento en el nivel de estrés oxidativo, el cual se ha propuesto, es uno de los principales mecanismos asociados a la activación crónica de esta zona (Gao y cols. 2007; Lindley y cols. 2004). Las enzimas más importantes que controlan el estado oxido-reducción celular en HF son la CuZn-SOD y la NOX (Gao y cols. 2007). Nuestros datos muestran que en ratas con HFpEF, existe un aumento de la fosforilación de p-47^{phox}, una subunidad de la NOX, sin cambios significativos en la expresión de la CuZn-SOD en la RVLM de ratas HFpEF. Estos datos sugieren que la actividad de las enzimas prooxidantes son las que estarían contribuyendo a la formación de ROS en la RVLM, y no cambios en la expresión de enzimas antioxidantes. De manera importante, 6 semanas de ejercicio físico disminuyen la hiper-fosforilación de la p-47^{phox} y la formación de ROS en la RVLM en ratas con HFpEF. Otro de los mecanismos que contribuirían a la formación de ROS en el RVLM en HF es la activación del sistema renina-angiotensina cerebral (Kishi y

cols. 2004; Kishi 2012). Más aún, se ha demostrado que la angiotensina II activaría a la NOX, vía activación del receptor AT1 (Braga y cols. 2011; Kishi 2012; Kishi y cols. 2013). En la presente tesis no se evaluó el nivel de expresión del receptor AT1 en la RVLM. Por lo tanto, no podemos descartar que los efectos del ejercicio sobre la formación de ROS también incluyen una menor activación del sistema renina-angiotensina en el cerebro. Futuras investigaciones deben ahondar en los mecanismos celulares asociados a los efectos beneficiosos del ejercicio físico sobre la formación de ROS, la activación de neuronas pre-simpáticas del RVLM y el desbalance autonómico cardíaco en HFpEF.

9.8. Rol del ejercicio físico sobre la incidencia de arritmias cardíacas en ratas con HFpEF.

Los animales con HFpEF tienen una elevada incidencia de eventos arrítmicos. Tomando en consideración que las arritmias cardíacas son comunes en los pacientes con HF (Pandey y cols. 2015) y que son un predictor de mortalidad, nos propusimos determinar si es que el ejercicio físico podría disminuirlas (Esler 1998; Giannoni y cols. 2008). Nuestros datos muestran que la incidencia de eventos arrítmicos es mayor en los animales con HFpEF sedentarios en comparación a los animales Sham sedentarios, y de manera importante, el ejercicio físico las disminuye en las ratas con HFpEF. Tomando en consideración que el ejercicio físico disminuye el control simpático en los animales con HFpEF, es posible hipotetizar que uno de los mecanismos asociados a la disminución de las arritmias cardíacas

en HFpEF después de 6 semanas de ejercicio físico, sean dependientes de la normalización del control autonómico cardíaco.

9.9. Tolerancia/intolerancia al ejercicio físico y su rol en la función cardíaca en animales con HFpEF.

La intolerancia al ejercicio físico se caracteriza principalmente por una reducción severa en la capacidad de ejercicio (Szlachcic y cols. 1985). Independiente de la etiología de la HF, los pacientes con HF presentan una elevada intolerancia al ejercicio físico (Upadhyay y cols. 2015). Nuestros resultados muestran que un 44% de nuestros animales con HFpEF presentan intolerancia al ejercicio físico, lo cual no fue observado en los animales Sham. Tabet y cols. (2008), mostraron que los pacientes con HF intolerantes al ejercicio físico tienen una incidencia de mortalidad mayor que los pacientes tolerantes al ejercicio físico. De manera importante, estos autores encontraron que la intolerancia al ejercicio físico no era dependiente del grado inicial de insuficiencia cardíaca (Tabet y cols. 2008). Nuestros datos también muestran que la intolerancia al ejercicio físico en ratas con HFpEF, no depende del grado inicial de la HF, sugiriendo que existen otros mecanismos asociados a la intolerancia al ejercicio físico.

Encontramos que el ExT en ratas con HFpEF mejora la función cardíaca sistólica solo en animales tolerantes al ejercicio. Es más, las ratas HFpEF intolerantes al ejercicio físico presentan un deterioro aún mayor en la función cardíaca diastólica en comparación a los

animales HFpEF sedentarios. Estos datos sugieren que el ejercicio físico en estos animales podría tener efectos adversos sobre la función cardíaca. Interesantemente, se ha propuesto que el ejercicio físico no sería transversalmente beneficioso para todos los pacientes, de hecho, podrían tener efectos perjudiciales en la fisiopatología de los pacientes con HFpEF (Piña y cols. 2008).

9.10. Rol de la intolerancia al ejercicio físico sobre la incidencia de eventos arrítmicos en ratas con HFpEF.

Por otro lado, los animales HFpEF tolerantes al ejercicio físico muestran una mejora significativa en la incidencia de arritmias cardíacas. Por el contrario, se observó que los animales HFpEF intolerantes al ejercicio físico no muestran mejoras en arritmogénesis. Más aún, se observó que el control simpático sigue igualmente elevado en comparación a las ratas HFpEF sedentarias. Considerando que previamente demostramos que en HFpEF las arritmias cardíacas serían parcialmente dependientes del control simpático, es posible que el efecto nulo sobre las arritmias cardíacas en las ratas con HFpEF intolerantes al entrenamiento, se deba a que el ejercicio físico es incapaz de disminuir el control simpático cardíaco en este grupo de animales.

9.11. Rol de los quimiorreceptores periféricos sobre la incidencia de mortalidad en ratas HFpEF intolerantes al ejercicio físico.

Se ha propuesto que el aumento del quimiorreflejo periférico en ratas infartadas contribuye significativamente al aumento simpático (Del Rio y cols. 2013; Marcus y cols. 2014; Niewinski y cols. 2016). Más aún, la ablación selectiva de los CB restablece el balance autonómico en ratas con HF inducido por un infarto (Del Rio y cols. 2013). Nuestros resultados muestran que las ratas con HFpEF tiene un quimiorreflejo carotideo normal respecto a la condición control, lo cual sugiere que no contribuyen significativamente a la fisiopatología de la HFpEF. Sin embargo, las ratas HFpEF intolerantes al ejercicio físico presentan una disminución en la ganancia de la respuesta ventilatoria a la hipoxia y más importante aún, durante la estimulación con un nivel de hipoxia moderado (F_{iO_2} 10%), se desencadenan arritmias letales las que disminuyen la sobrevida. En efecto, se puede observar que existe un aumento importante del control simpático y una caída abrupta de la presión intraventricular, que conllevan a un 40% de mortalidad. Tabet y cols. (2008) mostró que pacientes que presentan intolerancia al ejercicio físico tienen una menor tasa de sobrevivencia en comparación a pacientes que si toleran el ejercicio físico. Sin embargo, en esa investigación no se describe cual es el nivel de balance autonómico, ni tampoco si el quimiorreflejo de estos pacientes era diferente entre los grupos experimentales (Tabet y cols. 2008). Nuestros resultados sugieren que la tolerancia/intolerancia al ejercicio físico por parte de los animales con HFpEF, podría estar parcialmente mediados por la ganancia quimiosensorial periférica.

Los principales quimiorreceptores periféricos son los CB (Iturriaga y Alcaayaga 2004). Estos órganos están estratégicamente ubicados en la bifurcación de la arteria carotidea, y detectan los cambios arteriales de presión parcial de oxígeno, antes de que la sangre llegue al cerebro (Iturriaga y Alcaayaga 2004). Recientemente, se ha sugerido que los CB serían también sensores metabólicos que detectarían rápidamente los cambios ocurridos durante el ejercicio, desencadenando una respuesta ventilatoria durante la misma actividad (Parkes y cols. 2013). Nuestros resultados muestran que los animales con HFpEF intolerantes al ejercicio físico tienen una disminución significativa en la ganancia de la respuesta ventilatoria a la hipoxia. Estos datos sugieren que los quimiorreceptores periféricos podrían contribuir a la performance en ejercicio. Para comprobar esto, destruimos los CB en animales controles y observamos que después de la ablación selectiva de los CB la performance aeróbica disminuyó significativamente. Luego de esto extendimos nuestros experimentos a animales HFpEF tolerantes al ejercicio físico. Después de la ablación selectiva de los CB, los animales HFpEF tolerantes al ejercicio físico disminuyen su performance aeróbica de manera significativa. Estos resultados son concordantes con la literatura existente, en donde se ha reportado que pacientes con asma, a los cuales se les extirparon los CB, muestran una disminución significativa del consumo máximo de oxígeno (Honda 1985). Además, Masuda y cols. (1988) mostraron que la inactivación de los quimiorreceptores periféricos con 95% O₂ con 5% de CO₂ durante el ejercicio, disminuye la respuesta ventilatoria al ejercicio.

Nuestros resultados demuestran que la tolerancia al ejercicio físico en animales controles y HFpEF tolerantes al ejercicio físico dependería de la integridad de los quimiorreceptores del CB. Por otro lado, nuestros resultados sugieren fuertemente que la intolerancia al ejercicio físico en animales HFpEF, se podría deber a una disminución en la actividad de los CBs, lo cual fue medido indirectamente por la respuesta ventilatoria a la hipoxia. Futuras investigaciones deberán dilucidar los mecanismos relacionados a la intolerancia al ejercicio físico en animales con HFpEF y el rol de los CBs en el “*setting*” de la performance al ejercicio físico (Figura 48).

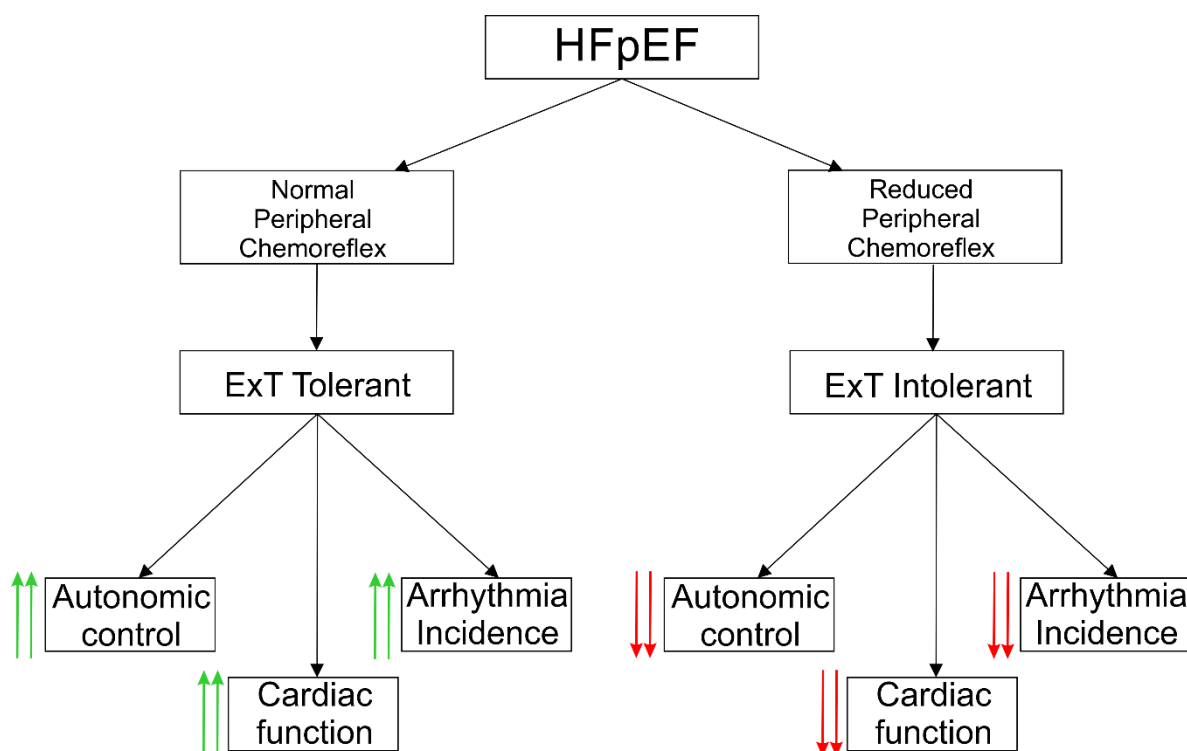


Figura 48. Representación esquemática de los efectos del ejercicio físico en animales con HFpEF tolerantes he intolerantes al ejercicio físico. Las ratas con HFpEF se dividen en dos fenotipos: i) animales con un quimiorreflejo periférico normal y; ii) animales con un quimiorreflejo periférico disminuido. Las ratas con HFpEF que presentan un quimiorreflejo periférico normal, son tolerantes al ejercicio físico (ExT) y después de un programa crónico de entrenamiento mejoran: el control autonómico, la incidencia de eventos arrítmicos y la función cardíaca. Por el contrario, las ratas con HFpEF que presentan un quimiorreflejo periférico disminuido, tienen intolerancia al ExT y empeoran o no muestran mejoras en el control autonómico, la incidencia de eventos arrítmicos y la función cardíaca. Flechas verdes: mejora; flechas rojas: empeoramiento o efecto nulo del ExT.

10.- CONCLUSIONES

Ratas con HFpEF presentan aumentos de ROS e hiper-activación de neuronas pre-simpáticas alojadas en la RVLM, las que comandan la simpatoexcitación, la arritmogénesis y la pérdida progresiva de función cardíaca durante la progresión de la HFpEF. Además, encontramos que en ratas con HFpEF la estimulación aguda con hipercapnia, que activa preferentemente quimiorreceptores centrales, desencadena un aumento aún mayor del tono simpático junto con un aumento concomitante en la incidencia de arritmias y deterioro mayor de la función cardíaca.

El ejercicio físico de moderada intensidad redujo la formación de ROS en el RVLM, restauró el balance autonómico cardíaco y la ganancia del barorreflejo, disminuyó la incidencia de arritmias y mejoró de manera significativa la función cardíaca, solo en ratas con HFpEF tolerantes al ejercicio. Por el contrario, el ejercicio físico demostró tener efectos deletéreos sobre el balance autonómico, arritmias y función cardíaca en animales HFpEF intolerantes al ejercicio. Los mecanismos relacionados a la tolerancia/intolerancia al ejercicio físico en HFpEF parecen estar relacionados con cambios en la actividad de los quimiorreceptores periféricos del CB ya que la eliminación de estos en animales sanos disminuye la performance. Más importante aún, la eliminación de los CBs en ratas HFpEF tolerantes al ejercicio resulta en el cambio del fenotipo tolerante al intolerante. Acorde con estos resultados, los animales con HFpEF intolerantes al ejercicio muestran una ganancia del quimiorreflejo

periférico disminuido. Nuevas y futuras investigaciones deberán dilucidar los mecanismos precisos que explicarían la contribución del CB sobre la tolerancia al ejercicio físico.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral sugieren que el ejercicio físico de moderada intensidad es una estrategia no farmacológica efectiva para normalizar el balance autonómico, la función cardíaca y la progresión del deterioro cardíaco en ratas con HFpEF que toleran el ejercicio.

11.- BIBLIOGRAFÍA

- Abassi, Z., Goltsman, I., Karram, T., Winaver, J., Hoffman, A. Aorticaval fistula in rat: a unique model of volume-overload congestive heart failure and cardiac hypertrophy. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:729497.
- Abbott, S. B., DePuy, S. D., Nguyen, T., Coates, M. B., Stornetta, R. L., Guyenet, P. G. Selective optogenetic activation of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons produces cardiorespiratory stimulation in conscious mice. *J. Neurosci.* 2013; 33:3164-3177.
- Abbott, S. B., Stornetta, R. L., Socolovsky, C. S., West, G. H., Guyenet, P. G. Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventrolateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *J Physiol.* 2009; 587:5613-5631.
- Agarwal, S. K., Calaresu, F. R. Monosynaptic connection from caudal to rostral ventrolateral medulla in the baroreceptor reflex pathway. *Brain res.* 1991; 555:70-74.
- Almado, C. E. L., Machado, B. H. Respiratory and autonomic responses to microinjection of NMDA and AMPA into the commissural subnucleus of the NTS of awake rats. *Brain res.* 2005; 1063:59-68.
- Andrade, D. C., Lucero, C., Toledo, C., Madrid, C., Marcus, N. J., Schultz, H. D., Del Rio, R. Relevance of the carotid body chemoreflex in the progression of heart failure. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015:467597.
- Angadi, S. S., Mookadam, F., Lee, C. D., Tucker, W. J., Haykowsky, M. J., Gaesser, G. A. High-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous exercise training in heart failure with preserved ejection fraction: A pilot study. *J. Appl. Physiol.* 2014; 119:753-758.
- Antonicelli, R., Spazzafumo, L., Scalvini, S., Olivieri, F., Matassini, M. V., Parati, G., Del Sindaco, D., Gallo, R., Lattanzio, F. Exercise: a “new drug” for elderly patients with chronic heart failure. *Aging.* 2016; 8:860-872.

- Atanasova, D.Y., Iliev, M.E., Lazarov, N.E. Morphology of the rat carotid body. *Biomedical Reviews* 2011; 22: 41-55.
- Banes, A. K., Shaw, S. M., Tawfik, A., Patel, B. P., Ogbi, S., Fulton, D., Marrero, M. B. Activation of the JAK/STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin. *Am J. Physiol. Cell Physiol.* 2005; 288:C805-C812.
- Bedard, K., Krause, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. rev.* 2007; 87:245-313.
- Benarroch, E. E. Neuropeptides in the sympathetic system: presence, plasticity, modulation, and implications. *Ann. Neurol.* 1994; 36:6-13.
- Besnier, F., Labrunée, M., Pathak, A., Pavy-Le Traon, A., Galès, C., Sénard, J.M., Guiraud, T., Exercise training-induced modification in autonomic nervous system: An update for cardiac patients. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 2017; 60:27-35.
- Blessing, W. W. Distribution of glutamate decarboxylase-containing neurons in rabbit medulla oblongata with attention to intramedullary and spinal projections. *Neuroscience* 1990; 37:171-185.
- Borlaug, B. A. Mechanisms of exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction. *Circ. J.* 2014; 78:20-32.
- Bowen, T. S., Rolim, N. P., Fischer, T., Baekkerud, F. H., Medeiros, A., Werner, S., Brønstad, E., Rognmo, O., Mangner, N., Linke, A., Schuler, G., Silva, G. J., Wisløff, U., Adams, V; Optimex Study Group. Heart failure with preserved ejection fraction induces molecular, mitochondrial, histological, and functional alterations in rat respiratory and limb skeletal muscle. *Eur. J. Heart Fail.* 2015; 17:263-272.
- Bracciali, A. L., Bonagamba, L. G., Machado, B. H. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2008; 161:246-252.
- Braga, V. A., Medeiros, I. A., Ribeiro, T. P., França-Silva, M. S., Botelho-Ono, M. S., Guimarães, D. D. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-

- PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2011; 44:871-876.
- Byrne, J. A., Grieve, D. J., Cave, A. C., Shah, A. M. Oxidative stress and heart failure. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 2003; 96:214-221.
- Cahalin, L. P., Mathier, M. A., Semigran, M. J., Dec, G. W., DiSalvo, T. G. The six-minute walk test predicts peak oxygen uptake and survival in patients with advanced heart failure. *Chest.* 1996; 110:325-332.
- Castro, P., Vukasovic, J. L., Garces, E., Sepulveda, L., Ferrada, M., Alvarado, S. Cardiac failure in Chilean hospitals: results of the National Registry of Heart Failure, ICARO. *Rev. med. Chil.*, 2004; 132:655-662.
- Chen, J. S., Wang, W., Bartholet, T., Zucker, I. H. Analysis of baroreflex control of heart rate in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Circulation.* 1991; 83:260-267.
- Cingolani, O. H., Yang, X. P., Liu, Y. H., Villanueva, M., Rhaleb, N. E., Carretero, O. A. Reduction of cardiac fibrosis decreases systolic performance without affecting diastolic function in hypertensive rats. *Hypertension.* 2004; 43:1067-1073..
- Coats, A. J., Adamopoulos, S., Radaelli, A., McCance, A., Meyer, T. E., Bernardi, L., Forfar, C. O. N. W. A. Y. Controlled trial of physical training in chronic heart failure. Exercise performance, hemodynamics, ventilation, and autonomic function. *Circulation.* 1992; 85:2119-2131..
- Cohn, J. N., Levine, T. B., Olivari, M. T., Garberg, V., Lura, D., Francis, G. S., Rector, T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 1984; 311: 819-823.
- da Silva, A. A., do Carmo, J., Dubinion, J., Hall, J. E. The role of the sympathetic nervous system in obesity-related hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2009; 11:206-211.

- Dampney, R. A., Goodchild, A. K., Tan, E. Vasopressor neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rabbit. *J Auton Nerv Syst.* 1985; 14:239-254.
- DelRio, R., Moya, E. A., Iturriaga, R. Carotid body and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia: the oxidative link. *Eur. Respir. J.* 2010; 36:143-150.
- Del Rio, R., Marcus, N. J., Schultz, H. D. Carotid chemoreceptor ablation improves survival in heart failure: rescuing autonomic control of cardiorespiratory function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 62:2422-2430.
- Del Rio, R., Andrade, D. C, Lucero, C., Arias, P., Iturriaga, R. Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. *Hypertension* 2016; 68:436-445.
- DeLeo, F. R., Quinn, M. T. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukoc. Biol.* 1996; 60:677-691.
- Diaz-Velez, C. R., Garcia-Castineiras, S., Mendoza-Ramos, E., Hernandez-Lopez, E. Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am. Heart J.* 1996; 131:146-152.
- Dieberg, G., Ismail, H., Giallauria, F., Smart, N. A. Clinical outcomes and cardiovascular responses to exercise training in heart failure patients with preserved ejection fraction: a systematic review and meta-analysis. *J. Appl. Physiol.* 2015; 119:726-733.
- Ding, Y., Li, Y. L., Zimmerman, M. C., Davisson, R. L., Schultz, H. D. Role of CuZn superoxide dismutase on carotid body function in heart failure rabbits. *Cardiovasc. Res.* 2009;81, 678-685.
- Donald, D. E., Shepherd, J. T. Autonomic regulation of the peripheral circulation. *Annu. Rev. Physiol.* 1980; 42:429-439.
- Edelmann, F., Gelbrich, G., Düngen, H. D., Fröhling, S., Wachter, R., Stahrenberg, R., y cols. Exercise Training Improves Exercise Capacity and Diastolic Function in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Results of the Ex-

- DHF (Exercise training in Diastolic Heart Failure) Pilot Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 58:1780-1791.
- Esler, M. High blood pressure management: potential benefits of I1 agents. *J. Hypertens. Suppl.* 1998; 16:S19-24.
- Flaim, S. F., Minter, W. J., Nellis, S. H., Clark, D. P. Chronic arteriovenous shunt: evaluation of a model for heart failure in rat. *Am. J. Physiol.* 1979; 236:H698-704.
- Florea, V. G., Cohn, J. N. The autonomic nervous system and heart failure. *Circ. Res.* 2014; 114:1815-1826.
- Francis, G. S. Neurohumoral mechanisms involved in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 1985; 55:15A-21A.
- Gao, L., Wang, W., Li, Y. L., Schultz, H. D., Liu, D., Cornish, K. G., Zucker, I. H. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ. res.* 2004; 95:937-944.
- Gao, L., Wang, W., Liu, D., Zucker, I. H. Exercise training normalizes sympathetic outflow by central antioxidant mechanisms in rabbits with pacing-induced chronic heart failure. *Circulation.* 2007; 115:3095-3102.
- Gao, L., Wang, W. Z., Wang, W., Zucker, I. H. Imbalance of angiotensin type 1 receptor and angiotensin II type 2 receptor in the rostral ventrolateral medulla: potential mechanism for sympathetic overactivity in heart failure. *Hypertension.* 2008; 52:708-714.
- Garcia, R., Diebold, S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc. res.* 1990; 24:430-432.
- Gary, R. Exercise self-efficacy in older women with diastolic heart failure: results of a walking program and education intervention. *J. Gerontol. Nurs.* 2006; 32:31-39.
- Giannoni, A., Emdin, M., Bramanti, F., Iudice, G., Francis, D. P., Barsotti, A., Piepoli, M., Passino, C. Combined Increased Chemosensitivity to Hypoxia and Hypercapnia as a Prognosticator in Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 53:1975-1980.

- Giannoni, A., Emdin, M., Poletti, R., Bramanti, F., Prontera, C., Piepoli, M. Passino C. Clinical significance of chemosensitivity in chronic heart failure: influence on neurohormonal derangement, Cheyne-Stokes respiration and arrhythmias. *Clin. Sci.* 2008;114, 489-497.
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev.* 1994;74:829–898
- Granjeiro, É. M., Machado, B. H. NO in the caudal NTS modulates the increase in respiratory frequency in response to chemoreflex activation in awake rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009; 166:32-40.
- Griffioen, K. J., Kamendi, H. W., Gorini, C. J., Bouairi, E., Mendelowitz, D. Reactive oxygen species mediate central cardiorespiratory network responses to acute intermittent hypoxia. *J Neurophysiol.* 2007; 97:2059-66.
- Guertzenstein, P. G., Silver, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J. Physiol.* 1974;242:489-503.
- Guyenet, P. G., Abbott, S. B., Stornetta, R. L. The respiratory chemoreception conundrum: light at the end of the tunnel?. *Brain Res.* 2013; 1511:126-137.
- Guyenet, P. G., Bayliss, D. A., Stornetta, R. L., Kanbar, R., Shi, Y., Holloway, B. B., Souza, G. M. P. R., Basting, T. M., Abbott, S. B. G., Wenker, I. C. Interdependent feedback regulation of breathing by the carotid bodies and the retrotrapezoid nucleus. *J. Physiol.* 2017. doi: 10.1113/JP274357.
- Guyenet, P. G., Bayliss, D. A., Stornetta, R. L., Ludwig, M. G., Kumar, N. N., Shi, Y., Burke, P. G., Kanbar, R., Basting, T. M., Holloway, B. B. Wenker, I. C. Proton detection and breathing regulation by the retrotrapezoid nucleus. *J. Physiol.* 2016; 594:1529-1551.
- Guyenet, P. G., Stornetta, R. L., Abbott, S. B., Depuy, S. D., Fortuna, M. G. Kanbar, R. Central CO₂ chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. *J. Appl. Physiol.* 2010; 108:995-1002.

- Guyenet, P. G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr. Physiol.* 2014; 4:1511-1562.
- Haack, K. K., Engler, C. W., Papoutsis, E., Pipinos, I. I., Patel, K. P., Zucker, I. H. Parallel changes in neuronal AT1R and GRK5 expression following exercise training in heart failure. *Hypertension.* 2012; 60:354-361.
- Hagglund, H., Uusitalo, A., Peltonen, J. E., Koponen, A. S., Aho, J., Tiinanen, S., Seppänen, T., Tulppo, M., Tikkanen, H. O. Cardiovascular autonomic nervous system function and aerobic capacity in type 1 diabetes. *Front. Physiol.* 2012; 3:356.
- Hare, J. M., Johnson, R. J. Uric acid predicts clinical outcomes in heart failure: insights regarding the role of xanthine oxidase and uric acid in disease pathophysiology. *Circulation.* 2003; 107:1951-1953.
- Haykowsky, M., Brubaker, P., Kitzman, D. Role of physical training in heart failure with preserved ejection fraction. *Curr. Heart Fail. Rep.* 2012; 9:101-106.
- Heart Failure Society of A. Executive Summary: HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. *J. Card. Fail.* 2010;16:475-539.
- Heymes, C., Bendall, J. K., Ratajczak, P., Cave, A. C., Samuel, J. L., Hasenfuss, G., Shah A. M. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003; 41:2164-2171.
- Holloway, B. B., Viar, K. E., Stornetta, R. L., Guyenet, P. G. The retrotrapezoid nucleus stimulates breathing by releasing glutamate in adult conscious mice. *Eur. J. Neurosci.* 2015; 42:2271-2282.
- Honda, Y. Role of Carotid Chemoreceptors in Control of Breathing at Rest and in Exercise: Studies on Human Subjects with Bilateral Carotid Body Resection. *Jpn. J. Physiol.* 1985; 35:535-544.
- Hsu, C. Y., Hsieh, P. L., Hsiao, S. F., Chien, M. Y. Effects of exercise training on autonomic function in chronic heart failure: systematic review. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015:591708.

- Iturriaga, R., Alcayaga, J. Neurotransmission in the carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain. Res. Rev.* 2004; 47: 46-53.
- Jackson, K., Silva, H. M., Zhang, W., Michelini, L. C., Stern, J. E. Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neurophysiol.* 2005; 94:3211-3220.
- Jessup, M., Brozena, S. Heart failure. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348:2007-2018.
- Johnson, J. O., Hemmings, H. C., Talmage, D. E. Autonomic nervous system physiology, in pharmacology and physiology for anesthesia. Saunders, Philadelphia, pp. 2013; 208-217.
- Kass, D. A., Bronzwaer, J. G. F., Paulus, W. J. What Mechanisms Underlie Diastolic Dysfunction in Heart Failure? *Circ. res.* 2004; 94:1533-42.
- Keith, M., Geranmayegan, A., Sole, M. J., Kurian, R., Robinson, A., Omran, A. S., y cols. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 31:1352-1356.
- Kirchheim, H. R. Systemic arterial baroreceptor reflexes. *Physiol. Rev.* 1976; 56:100-177.
- Kishi, T. Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. *J. Cardiol.* 2012; 59:117-122.
- Kishi, T. Regulation of the sympathetic nervous system by nitric oxide and oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla: 2012 Academic Conference Award from the Japanese Society of Hypertension. *Hypertens. Res.* 2013; 36:845-851.
- Kitzman, D. W., Brubaker, P. H., Morgan, T. M., Stewart, K. P., Little, W. C. Exercise training in older patients with heart failure and preserved ejection fraction: a randomized, controlled, single-blind trial. *Circ. Heart Fail.* 2010; 3:659-667.

- Kitzman, D. W., Little, W. C., Brubaker, P. H, y cols. PAthophysiological characterization of isolated diastolic heart failure in comparison to systolic heart failure. *JAMA*. 2002;288:2144-2150.
- Kleiber, A. C., Zheng, H., Schultz, H. D., Peuler, J. D., Patel, K. P. Exercise training normalizes enhanced glutamate-mediated sympathetic activation from the PVN in heart failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008; 294:R1863-1872.
- Klotz S, Hay I, Dickstein ML, Yi GH, Wang J, Maurer MS, Kass DA, Burkhoff D. Single-beat estimation of end-diastolic pressure-volume relationship: a novel method with potential for noninvasive application. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:403-412.
- Klotz S, Dickstein ML, Burkhoff D. A computational method of prediction of the end-diastolic pressure–volume relationship by single beat. *Nature Protocols*. 2007;(9): 2152–2158
- Korner, P. I. Integrative neural cardiovascular control. *Physiol. rev.* 1971; 51:312-367.
- Kristen, A. V., Just, A, Haass, M. Seller, H. Central hypercapnic chemoreflex modulation of renal sympathetic nerve activity in experimental heart failure. *Basic res. Cardiol.* 2002; 97:177-186.
- La Rovere, M. T., Bersano, C., Gnemmi, M., Specchia, G., Schwartz, P. J. Exercise-induced increase in baroreflex sensitivity predicts improved prognosis after myocardial infarction. *Circulation*. 2002; 106:945-949
- Lai, C. J., Yang, C. C., Hsu, Y. Y., Lin, Y. N., Kuo, T. B. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. *J. Appl. Physiol.* 2006; 100:1974-1982.
- Lazarenko, R. M., Milner, T. A., Depuy, S. D., Stornetta, R. L., West, G. H., Kievits, J. A, Bayliss, D. A., Guyenet, P. G. Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 2009; 517:69-86.

- Li, Y. L., Ding, Y., Agnew, C., Schultz, H. D. Exercise training improves peripheral chemoreflex function in heart failure rabbits. *J. Appl. Physiol.* 2008; 105:782-90.
- Lindley, T. E., Doobay, M. F., Sharma, R. V., Davisson, R. L. Superoxide Is Involved in the Central Nervous System Activation and Sympathoexcitation of Myocardial Infarction–Induced Heart Failure. *Circ. res.* 2004; 94:402-409.
- Malheiros-Lima, M. R., Takakura, A. C., Moreira, T. S. Depletion of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons impairs the hypoxic ventilatory response in conscious rats. *Neuroscience.* 2017; 351:1-14.
- Mallat, Z., Philip, I., Lebre, M., Chatel, D., Maclouf, J., Tedgui, A. Elevated Levels of 8-iso-Prostaglandin F₂ α in Pericardial Fluid of Patients With Heart Failure: A Potential Role for In Vivo Oxidant Stress in Ventricular Dilatation and Progression to Heart Failure. *Circulation.* 1998; 97:1536-1539.
- Malheiros-Lima, M. R., Takakura, A. C., Moreira, T. S. Depletion of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons impairs the hypoxic ventilatory response in conscious rats. *Neuroscience.* 2017;351:1-14.
- Mancini, D. M., Eisen, H., Kussmaul, W., Mull, R., Edmunds, L. H. Jr., Wilson, J. R. Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation.* 1991; 83:778-786.
- Marcus, N. J., Del Rio, R., Schultz, E. P., Xia, X. H., Schultz, H. D. Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates disordered breathing in congestive heart failure. *J. Physiol.* 2014; 592:391-408.
- Masuda, A., Paulev, P. E., Sakakibara, Y., Ahn, B., Takaishi, S., Pokorski, M., Nishibayashi, Y., Honda, Y. Estimation of peripheral chemoreceptor contribution to exercise hyperpnea in man. *Jpn. J. Physiol.* 1988; 38:607-18.
- McCord, J. M., Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 1969; 244:6049-6055.

- Micheline, L. C., Stern, J. E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp. physiol.* 2009; 94:947-960.
- Millhorn, D. E. Neural respiratory and circulatory interaction during chemoreceptor stimulation and cooling of ventral medulla in cats. *J Physiol.* 1986; 370:217-231.
- Monnet, E., Chachques, J. C. Animal Models of Heart Failure: What Is New? *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 79:1445-1453.
- Moreira, T. S., Takakura, A. C., Colombari, E., Guyenet, P. G. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. *J. Physiol.* 2006; 577:369-386.
- Mosterd, A. and A.W. Hoes, Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*, 2007. 93:p. 1137-1146.
- Mousa, T. M., Liu, D., Cornish, K. G., Zucker, I. H. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. *J. Appl. Physiol.* 2008; 104:616-624.
- Mulkey, D. K., Wenker, I. C., Kreneisz, O. Current ideas on central chemoreception by neurons and glial cells in the retrotrapezoid nucleus. *J. Appl. Physiol.* 2010; 108: 1433-1439.
- Murad, K., Brubaker, P. H., Fitzgerald, D. M, Morgan, T. M, Goff, D. C. Jr., Soliman, E. Z., Eggebeen, J. D., Kitzman, D. W. Exercise training improves heart rate variability in older patients with heart failure: a randomized, controlled, single-blinded trial. *Congest. Heart Fail.* 2012; 18:192–197.
- Narkiewicz, K., Pesek, C. A., van de Borne, P. J., Kato, M. Somers, V. K. Enhanced sympathetic and ventilatory responses to central chemoreflex activation in heart failure. *Circulation.* 1999; 100:262-267.
- Nattie, E. Li, A. Central chemoreceptors: locations and functions. *Compr. Physiol.* 2012; 2: 221-254.

- Negrao, C. E., Middlekauff, H. R. Exercise training in heart failure: reduction in angiotensin II, sympathetic nerve activity, and baroreflex control. *J. Appl. Physiol.* 2008; 104:577-578.
- Niebauer, M., Zucker, I. H. Static and dynamic responses of carotid sinus baroreceptors in dogs with chronic volume overload. *J. Physiol.* 1985; 369:295-310.
- Niewinski, P., Janczak, D., Rucinski, A., Tubek, S., Engelman, Z, J., Piesiak, P., Jazwiec, P., Banasiak, W., Fudim, M., Sobotka, P. A., Javaheri, S., Hart, E. C., Paton, J. F., Ponikowski, P. Carotid body resection for sympathetic modulation in systolic heart failure: results from first-in-man study. *Eur. J. Heart Fail.* 2016; 19:391-400.
- Oikawaa, S., Hirakawab, H., Kusakabec, T., Nakashimaa, Y., Hayashidad, Y. Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. *Auton. Neurosci.* 2005; 117:105-114.
- Oliveira-Sales, E. B., Colombari, D. S., Davisson, R. L., Kasparov, S., Hirata, A. E., Campos, R. R., Paton, J. F. Kidney-induced hypertension depends on superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension.* 2010; 56:290-296.
- Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Batkai, S., Kass, D. A. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat. Protoc.* 2008; 3:1422-1434.
- Packer, M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992; 20:248-254.
- Pandey, A., Parashar, A., Kumbhani, D. J., Agarwal, S., Garg, J., Kitzman, D., Levine, B. D., Drazner, M., Berry, J. D. Exercise training in patients with heart failure and preserved ejection fraction: meta-analysis of randomized control trials. *Circ. Heart Fail.* 2015; 8:33-40.
- Pardaens, K., Vanhaecke, J., Fagard, R. H. Impact of age and gender on peak oxygen uptake in chronic heart failure. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1997; 29:733-737.

- Parkes, M. J. Evaluating the importance of the carotid chemoreceptors in controlling breathing during exercise in man. *Biomed. Res. Int.* 2013; 2013:893506.
- Paulus, W. J., Tschöpe, C., Sanderson, J. E., Rusconi, C., Flachskampf, F. A., Rademakers, F. E., Marino, P., Smiseth, O. A., De Keulenaer, G., Leite-Moreira, A. F., Borbély, A., Edes, I., Handoko, M. L., Heymans, S., Pezzali, N., Pieske, B., Dickstein, K., Fraser, A. G., Brutsaert, D. L. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 2007;28:2539-2550.
- Paulus, W. J., Tschöpe, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 62: 263-271.
- Paxinos, G., Watson, C. R. & Emson, P. C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J. Neurosci.* 1980; 3:129–149.
- Prabhakar, N. R., Peng, Y. J. Peripheral chemoreceptors in health and disease. *J. Appl. Physiol.* 2004; 96:359-366.
- Prasad, K., Gupta, J.B., Kalra, J., Lee, P., Mantha, S.V., Bharadwaj B. Oxidative stress as a mechanism of cardiac failure in chronic volume overload in canine model. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1996; 28:375-385.
- Pyner S. The paraventricular nucleus and heart failure. *Exp. Physiol.* 2014; 99:332-339.
- Robertson, D., Diedrich, A., Chapleau, M. W. Editorial on Arterial Baroreflex Issue. *Auton. Neurosci.* 2012; 172:1-3.
- Rodriguez-Artalejo, F., Guallar-Castillon, P., Banegas, J. R., del Rey Calero, J. Trends in hospitalization and mortality for heart failure in Spain, 1980-1993. *Eur. Heart J.* 1997; 18:1771-1779.

- Rommel, K. P., von Roeder, M., Latuscynski, K., Oberueck, C., Blazek, S., Fengler, K., Besler, C., Sandri, M., Lucke, C., Gutberlet, M., Linke, A., Schuler, G., Lurz, P. Extracellular volume fraction for characterization of patients with heart failure and preserved ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016; 67:1815-1825.
- Rosin, D. L., Chang, D. A., Guyenet, P. G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J. Comp. Neurol.* 2006; 499:64-89.
- Schiller, N. B., Shah, P. M., Crawford, M., DeMaria, A., Devereux, R., Feigenbaum, H., Gutgesell, H., Reichek, N., Sahn, D., Schnittger, I. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 1989; 2:358-367.
- Schreihöfer, A. M., Stornetta, R. L., Guyenet, P. G. Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat. *J. Physiol.* 2000; 529:221-236.
- Schultz, H. D., Sun, S. Y. Chemoreflex function in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2000; 5:45-56.
- Schwartz, P. J., La Rovere, M. T., De Ferrari, G. M. Mann, D. L. Autonomic modulation for the management of patients with chronic heart failure. *Circ. Heart Fail.* 2015; 8:619-628.
- Shenton, F. C., Pyner, S. Vagal afferents, sympathetic efferents and the role of the PVN in heart failure. *Auton. Neurosci.* 2016; 199:38-47.
- Shigematsu, H., Hirooka, Y., Eshima, K., Shihara, M., Tagawa, T., Takeshita, A. Endogenous angiotensin II in the NTS contributes to sympathetic activation in rats with aortocaval shunt. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001; 280:R1665-1673.

- Smart, N., Haluska, B., Jeffriess, L., Marwick, T. H. Exercise training in systolic and diastolic dysfunction: effects on cardiac function, functional capacity, and quality of life. *Am. Heart. J.* 2007; 153:530-536.
- Somers, V. K., Mark, A. L., Zavala, D. C., Abboud, F. M. Contrasting effects of hypoxia and hypercapnia on ventilation and sympathetic activity in humans. *J. Appl. Physiol.* 1989; 67:2101-2106.
- Spinale, F. G., Villarreal, F. Targeting Matrix Metalloproteinases in Heart Disease: Lessons from Endogenous Inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 2014; 90:7-15.
- Stornetta, R. L., Moreira, T. S., Takakura, A. C., Kang, B. J., Chang, D. A., West, G. H., Brunet, J. F., Mulkey, D. K., Bayliss, D. A., Guyenet, P. G. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J. Neurosci.* 2006; 26:10305-10314.
- Sun, SY WL, Wang W, Zucker IH, Schultz HD. Exercise training normalizes enhanced peripheral chemoreflex function in chronic heart failure rabbits. *The FASEB J.* 1999;13.
- Szlachcic, J., Massie, B. M., Kramer, B. L., Topic, N., Tubau, J. Correlates and prognostic implication of exercise capacity in chronic congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 1985; 55:1037-1042.
- Tabet, J. Y., Meurin, P., Beauvais, F., Weber, H., Renaud, N., Thabut, G., Cohen-Solal, A., Logeart, D., Ben Driss, A. Absence of exercise capacity improvement after exercise training program: a strong prognostic factor in patients with chronic heart failure. *Circ. Heart Fail.* 2008; 1:220-226.
- Taggart, P., Critchley, H., Lambiase, P. D. Heart-brain interactions in cardiac arrhythmia. *Heart.* 2011; 97:698-708.
- Takeuchi M, Igarashi Y, Tomimoto S, Odake M, Hayashi T, Tsukamoto T, Hata K, Takaoka H, Fukuzaki H. Single-beat estimation of the slope of the end-systolic pressure-volume relation in the human left ventricle. *Circulation.* 1991;83:202-212.

- Tammariello, S. P., Quinn, M. T., Estus, S. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci.* 2000; 20:RC53.
- ten Brinke EA, Klautz RJ, Verwey HF, van der Wall EE, Dion RA, Steendijk P. Single-beat estimation of the left ventricular end-systolic pressure-volume relationship in patients with heart failure. *Acta Physiol.* 2010;198:37-46.
- Toledo, C., Andrade, D. C., Lucero, C., Schultz, H. D., Marcus, N., Retamal, M., Madrid, C. Del Rio R. Contribution of peripheral and central chemoreceptors to sympatho-excitation in heart failure. *J. Physiol.* 2016; 2016:1-9.
- Tsutsui, H., Kinugawa, S., Matsushima, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011;301:H2181-90.
- Upadhyia, B., Haykowsky, M. J., Eggebeen, J., Kitzman, D. W. Exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction: more than a heart problem. *J. Geriatr. Cardiol.* 2015; 12:294-304.
- van Giersbergen, P. L., Palkovits, M., De Jong, W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. *Physiol. Rev.* 1992; 72:789-824.
- Veskoukis, A. S., Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Kokkinos, D., Nepka, C., Barbanis, S., Kouretas, D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2008; 33:1140-1154.
- Vialou V, Thibault M, Kaska S, et al. Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress. *Neuropharmacology.* 2015;99:28-37.
- Weber, K. T., Kinasewitz, G. T., Janicki, J. S., Fishman, A. P. Oxygen utilization and ventilation during exercise in patients with chronic cardiac failure. *Circulation.* 1982; 65:1213-23.

- Wenker IC, Sobrinho CR, Takakura AC, Mulkey DK, Moreira TS. P2Y1 receptors expressed by C1 neurons determine peripheral chemoreceptor modulation of breathing, sympathetic activity, and blood pressure. *Hypertension*. 2013;62:263–73.
- Wojciechowski, P., Juric, D., Louis, X. L., Thandapilly, S. J., Yu, L., Taylor, C., Netticadan, T. Resveratrol Arrests and Regresses the Development of Pressure Overload- but Not Volume Overload-Induced Cardiac Hypertrophy in Rats. *J. Nutr.* 2010; 140:962-968
- Yancy, C. W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, DE Jr., Drazner, M., Fonarow, G. C., Geraci, S. A., Horwich, T., Januzzi, J. L., Johnson, M. R., Kasper, E. K., Levy, W. C., Masoudi, F. A., McBride, P. E., McMurray, J. J., Mitchell, J. E., Peterson, P. N., Riegel, B., Sam, F., Stevenson, L. W., Tang, W. H., Tsai, E. J., Wilkoff, B. L. ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013; 128:1810-1852.
- Yeh, G. Y., McCarthy, E. P., Wayne, P. M., Stevenson, L. W., Wood, M. J., Forman, D., Davis, R. B., Phillips., R. S. Tai chi exercise in patients with chronic heart failure: a randomized clinical trial. *Arch. Intern. Med.* 2011; 171:750-757.
- Yoshimura, R., Sato, T., Kawada, T., Shishido, T., Inagaki, M., Miyano, H., Nakahara, T., Miyashita, H., Takaki, H., Tatewaki, T., Yanagiya, Y., Sugimachi, M., Sunagawa, K. Increased brain angiotensin receptor in rats with chronic high-output heart failure. *J. Card. Fail.* 2000; 6:66-72.
- Yu, C. M., Lin, H., Yang, H., Kong, S. L., Zhang, Q., Lee, S. W. Progression of systolic abnormalities in patients with "isolated" diastolic heart failure and diastolic dysfunction. *Circulation*, 2002; 105:p.1195-1201.
- Zucker, I. H. Novel mechanisms of sympathetic regulation in chronic heart failure. *Hypertension*. 2006; 48:1005-1011.