



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y  
PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PÉPTIDO NATRIURÉTICO  
AURICULAR (ANP) EN LAS VARIABLES FISIOLÓGICAS  
CARDIOPULMONARES DE CORDEROS RECIÉN NACIDOS EN  
ALTURA CON HIPERTENSIÓN PULMONAR.**

**Constanza Paola Guzmán Silva**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: ANÍBAL LLANOS MANSILLA  
Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile.

FINANCIAMIENTO FONDECYT 1140647

SANTIAGO, CHILE  
2017



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y  
PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PÉPTIDO NATRIURÉTICO  
AURICULAR (ANP) EN LAS VARIABLES FISIOLÓGICAS  
CARDIOPULMONARES DE CORDEROS RECIÉN NACIDOS EN  
ALTURA CON HIPERTENSIÓN PULMONAR.**

**Constanza Paola Guzmán Silva**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

Nota Final: .....

Profesor Guía: Aníbal Llanos Mansilla. ....

Profesor Corrector: Gustavo Farías Roldán. ....

Profesor Corrector: Víctor Hugo Parraguez Gamboa. ....

PROYECTO FONDECYT 1140647

SANTIAGO, CHILE  
2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero a mi familia, mis papis Matilde y Leopoldo y hermana Alejandra, que toda la vida han estado conmigo brindándome todo lo que he necesitado especialmente el cariño y las enseñanzas de vida, sin ellos no sería nada, y a mi gruñón abuelo Oscar, gracias por ser como son, los amo.

También a toda la gente del Programa de Fisiología y Fisiopatología del desarrollo, ICBM, especialmente a Felipe, Sebastian, Karin y Renato, que siempre estaban para un momento de risa y buena compañía, a Claudio, Emilio y Carlos que me enseñaron un sinfín de cosas durante la estadía en Putre realizando los estudios que se describen en esta memoria, al Doctor Llanos, que siempre tuvo la voluntad de enseñarme y explicarme todo lo que fuese necesario y dejarme ser parte de este proyecto, y a Germán, que fue un personaje fundamental en la realización de esto, me ayudo en todo y siempre estuvo ahí a pesar de tener miles de otras cosas que hacer, fue un gusto compartir con él y todos los personajes del laboratorio, gracias infinitas.

Al Doctor Farías, que fue un pilar fundamental, siempre estuvo para compartir y escuchar mis quejas, resolver mis dudas, hablar de la vida, guiarme en todo lo que estuvo a su alcance, fue un agrado enorme conocerlo fuera de la sala de clases, es el mejor.

A mis amigos y más que eso, Susana, Constanza, Matías, Paloma, Diego, Francisco, Rodrigo, Daniela, Camila, Javiera y muchos más, que siempre me preguntaban “¿y para cuando la tesis?”, me dieron el apoyo que solo ellos pueden darme, miles de momentos de distracción, cariño, risas, copuchas y excelentes momentos que seguirán sumándose luego de este paso, los adoro.

A mis peludos de cuatro patas Cosi Lover, Cona y Loki, que aunque suene extraño siempre fueron un apoyo moral mientras pasaba noches enteras despierta estudiando o escribiendo.

Y por último y no menos importante, a mi abuela Piedad, que donde quiera que esté, este paso enorme es para ella y su hermana Susana.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
Hipótesis.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Lugar y animales.....	17
Procedimiento quirúrgico.....	17
Administración de ANP o vehículo (NaCl 0,9%).....	18
Determinación de la dosis usada.....	18
Administración diaria de ANP.....	19
Experimento de hipoxia aguda isocápnic sobreimpuesta.....	20
Análisis estadístico de los datos.....	21
RESULTADOS.....	22
Determinación de la dosis de ANP.....	22
Efecto agudo de la infusión de ANP sobre variables cardiovasculares.....	23
Efecto del tratamiento con ANP y vehículo (NaCl 0,9%) en variables cardiovasculares basales.....	25

Determinación de la respuesta cardiopulmonar y gasometría arterial durante un episodio de hipoxia aguda isocápnic sobreimpuesta posterior al tratamiento.....	28
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXOS.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gasometría arterial durante hipoxia aguda isocápnica sobreimpuesta.....	28
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efecto agudo de la infusión diaria de ANP (5 µg/kg en 10 minutos) sobre la presión arterial pulmonar media (mPAP) en corderos gestados en grandes altitudes.....	23
Figura 2. Efecto agudo de la infusión diaria de ANP (5 µg/kg en 10 minutos) sobre el gasto cardiaco (GC; A, B, C) y la resistencia vascular pulmonar (RVP; D, E, F) en corderos gestados en grandes altitudes.....	24
Figura 3. Efecto de la infusión diaria de ANP o de vehículo (NaCl 0,9%) sobre la presión arterial pulmonar media (mPAP) en corderos gestados en grandes altitudes.....	25
Figura 4. Efecto de la infusión diaria de ANP o de vehículo (NaCl 0,9%) sobre el gasto cardiaco (GC) y la resistencia vascular pulmonar (RVP) en corderos gestados en grandes altitudes.....	26
Figura 5. Efecto de la infusión diaria de ANP o de vehículo (NaCl 0,9%) sobre la presión arterial sistémica media (mSAP) y la resistencia vascular sistémica (RVS) en corderos gestados en grandes altitudes.....	26
Figura 6. Efecto de la infusión diaria de ANP o de vehículo (NaCl 0,9%) sobre la frecuencia cardiaca (FC) en corderos gestados en grandes altitudes.....	27
Figura 7. Efecto de la hipoxia aguda sobreimpuesta en corderos gestados en grandes altitudes tratados previamente con ANP o vehículo (NaCl 0,9%) sobre la presión arterial pulmonar media (mPAP).....	29
Figura 8. Efecto de la hipoxia aguda sobreimpuesta en corderos gestados en grandes altitudes tratados previamente con ANP o vehículo (NaCl 0,9%) sobre el gasto cardiaco (GC) y la resistencia vascular pulmonar (RVP).....	30
Figura 9. Efecto de la hipoxia aguda sobreimpuesta en corderos gestados en grandes altitudes tratados previamente con ANP o vehículo (NaCl 0,9%) sobre la presión arterial sistémica media (mSAP) y la resistencia vascular sistémica (RVS).....	30

Figura 10. Efecto de la hipoxia aguda sobreimpuesta en corderos gestados en grandes altitudes tratados previamente con ANP o vehículo (NaCl 0,9%) sobre la frecuencia cardiaca (FC).....31



## **RESUMEN**

La hipertensión pulmonar en los recién nacidos es una patología causada por múltiples factores. Uno de ellos es la hipoxia aguda y/o crónica que altera los mecanismos que ocurren normalmente en la transición cardiovascular y respiratoria de feto a recién nacido, fenómeno que ocurre en gestaciones a grandes alturas o en gestaciones en tierras bajas que cursan con insuficiencia placentaria. Esta genera una importante vasoconstricción e hipertensión arterial en la circulación pulmonar, remodelamiento de los vasos pulmonares, reducción del lumen vascular y aumento de la resistencia vascular pulmonar, lo que puede llevar a hipertrofia ventricular derecha, eventualmente falla cardíaca y muerte. Además, la eficacia y disponibilidad de los tratamientos actuales es limitada. El péptido natriurético auricular (ANP) es un vasodilatador dependiente de cGMP, por lo que el objetivo de este estudio fue plantear una terapia basada en este péptido para reducir la presión pulmonar arterial pulmonar (mPAP) y la resistencia vascular pulmonar (RVP).

Para ello, se cateterizaron 14 corderos gestados y nacidos en tierras altas (3.600 m) de 3 o 4 días de edad, bajo anestesia, que presentan la mPAP elevada a causa de la altura. 2 corderos fueron utilizados para prueba de dosis. A 6 se les administró NaCl 0,9% (controles) y a otros 6 se les administró ANP durante 7 días, período en el cual se evaluaron las variables cardiopulmonares diariamente. Al final de este período, los neonatos se sometieron a un episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta evaluando la respuesta del fármaco a una crisis hipóxica.

Los animales tratados diariamente con ANP presentaron una disminución aguda de la mPAP que se mantuvo luego de la administración durante los 2 primeros días de tratamiento. Desde el tercer día en adelante esta disminución solo fue significativa durante la infusión del péptido. Además, el tratamiento crónico con el fármaco produjo una ausencia de la vasoconstricción pulmonar durante el episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta. Se concluye que el ANP podría ser considerado como un fármaco para ser utilizado en las crisis hipertensivas pulmonares que ocurren en la patología estudiada. Sin embargo, se debe buscar una opción de tratamiento que perdure con el pasar de los días.

Palabras claves: Hipertensión pulmonar, hipoxia, corderos, péptido natriurético auricular, vasodilatador.

## **ABSTRACT**

Pulmonary hypertension in newborns is a pathology caused by multiple factors. One of which is acute and / or chronic hypoxia that alters the mechanisms that normally occur in the cardiovascular and respiratory transition from fetus to newborn, phenomenon that occurs in gestations at great geographical altitudes or in lowland gestations with placental insufficiency. This generates an important vasoconstriction and arterial hypertension in the pulmonary circulation, remodeling of the pulmonary vessels, reduction of the vascular lumen and increasing the pulmonary vascular resistance, which can lead to right ventricular hypertrophy, and eventually heart failure and death. In addition, the efficacy and availability of current treatments is markedly limited. Atrial natriuretic peptide (ANP) is a cGMP-dependent vasodilator, so the aim of this study was to propose a therapy based on this peptide to reduce pulmonary arterial pulmonary pressure (mPAP) and pulmonary vascular resistance (PVR).

For that, 14 lambs gestated and born in the highlands (3,600 m) of 3 or 4 days of age were catheterized under anesthesia, presenting high mPAP due to height. 2 lambs were used for dose testing. 6 patients were given 0.9% NaCl (controls) and another 6 were given ANP for 7 days, during which time the cardiopulmonary variables were evaluated daily. At the end of this period, the neonates underwent an episode of overhyped acute hypoxia assessing the drug's response to a hypoxic crisis.

Animals treated daily with ANP showed an acute decrease in mPAP that remained after the infusion during the first 2 days of treatment. From the third day onwards the decrease was only significant during infusion period. In addition, chronic treatment with the drug produced an absence of pulmonary vasoconstriction during the episode of superimposed acute hypoxia. It is concluded that the ANP could be considered as a drug to be used in pulmonary hypertensive crises that occur in the pathology studied. However, a treatment option that will last as days go by should be looked for.

**Key words:** Pulmonary hypertension, hypoxia, lambs, atrial natriuretic peptide, vasodilator.

## INTRODUCCIÓN

La exposición a hipoxia crónica durante la gestación a grandes alturas induce hipertensión pulmonar en los recién nacidos (RN), definiendo ésta como presión arterial pulmonar media de 25 mmHg o más, en reposo (Simmoneau *et al.*, 2013). Este síndrome produce cambios estructurales y funcionales en el lecho vascular pulmonar, como aumento del grosor de la capa muscular y adventicia, con disminución de la elasticidad de las arterias pulmonares e hipertrofia del corazón derecho, llevando a la insuficiencia cardiaca y muerte (Penaloza y Arias-Stella, 2007; Herrera *et al.*, 2008). La hipoxia fetal crónica es producida por gestaciones en grandes altitudes de las hembras mamíferas gestantes, incluida la mujer. En tierras altas y bajas, la hipoxia fetal crónica produce insuficiencia placentaria, a lo que se agrega restricción de crecimiento intrauterino y en algunos pacientes a hipertensión pulmonar neonatal (Gagnon, 2003; Herrera *et al.*, 2007).

El síndrome de hipertensión pulmonar del recién nacido es una entidad clínica caracterizada por hipoxemia acentuada y cianosis generalizada, debido a la existencia de un cortocircuito de derecha a izquierda, a través del foramen oval y/o del *ductus arteriosus*, que condiciona un insuficiente flujo sanguíneo pulmonar por persistencia de presiones anormalmente elevadas en la arteria pulmonar. Puede presentarse en forma primaria o como una complicación de otro síndrome respiratorio y su prevalencia en humanos es aproximadamente de 2 por cada 1000 RN vivos (MINSAL, 2011); 0,5 a 6 por 1000 RN vivos en USA (Walsh-Sukys *et al.*, 2000), determinadas ambas prevalencias en RN de baja altitud. El actual tratamiento para esta patología se basa en óxido nítrico inhalado (iNO), junto con ventilación asistida, la cual no tiene efecto en el 30-50% de los neonatos tratados (Walsh-Sukys *et al.*, 2000). Es por ésta razón que se hace absolutamente necesario buscar nuevas terapias alternativas para esta enfermedad.

En Putre (Región de Arica y Parinacota) ubicado 3600 m.s.n.m., la población ovina nace con hipertensión pulmonar (Herrera *et al.*, 2007). El gran parecido anatómico y funcional de la circulación pulmonar entre neonatos humanos y ovinos, transforma a este último en un modelo adecuado para estudiar la fisiopatología y para probar nuevas alternativas terapéuticas para esta patología, entre ellas estimular la producción de guanósín monofosfato

cíclico (cGMP) vía guanilil ciclasa particulada (pGC), molécula clave en una de las vías más importantes de señalización vasodilatadoras (Gao y Raj, 2010).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta cardiopulmonar ante la administración exógena del péptido natriurético auricular (ANP), un estimulador de la pGC, como eventual tratamiento para la hipertensión pulmonar.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Durante la vida fetal, el diseño cardiovascular difiere sustancialmente del de la vida posnatal. Así, del 100% de la sangre que llega al ventrículo derecho, el 90% pasa por el *ductus arteriosus* a la aorta descendente (de esta sangre solo la tercera parte llega al cuerpo fetal y las dos terceras partes restantes llegan a la placenta) y sólo el 10% alcanza la circulación pulmonar, en notable vasoconstricción por la baja presión parcial de oxígeno (PO<sub>2</sub>) presente en el lecho vascular pulmonar fetal. El ventrículo izquierdo recibe el 35% del retorno venoso, sangre oxigenada que ha pasado por la comunicación interauricular de derecha a izquierda. El 63% de esta sangre es desviada al cerebro y a la parte superior del cuerpo, 8% a las coronarias y 29% hacia la parte inferior del cuerpo y la placenta (Rudolph, 1979).

Dichas características hacen que, la circulación pulmonar fetal se caracterice por presentar una alta resistencia y un bajo flujo, recibiendo solamente el 5-8% del gasto cardíaco combinado, la suma de gasto cardíaco derecho e izquierdo (Rudolph, 1979).

En la vida fetal, el intercambio gaseoso se lleva a cabo en la placenta, mientras que el pulmón tiene funciones metabólicas de secreción y de conversión enzimática de hormonas, entre otras (Rudolph, 1979). Es así, que al momento del nacimiento los pulmones se expanden y los vasos pulmonares se dilatan, principalmente por el aumento de PO<sub>2</sub> en los alvéolos y circulación pulmonar, disminuyendo la resistencia vascular pulmonar, aumentando notablemente en pocos minutos el flujo sanguíneo pulmonar en unas 10 veces. El aumento del flujo sanguíneo pulmonar produce un incremento del volumen de sangre y de presiones en el corazón izquierdo, disminuyendo el flujo sanguíneo que atraviesa el foramen oval hacia la aurícula izquierda (Rudolph, 1979; Abman, 1999). El líquido pulmonar se reabsorbe fundamentalmente por acción de los canales de sodio sensibles a amilorida (ENaC) acoplados a la Na-K-ATPasa y se inicia el intercambio gaseoso en el pulmón, incrementando la PO<sub>2</sub>. Este aumento provoca una notable vasodilatación pulmonar y cierre del *ductus arteriosus*, caída de la resistencia vascular y presión arterial pulmonar, lo que permite el paso del 100% del gasto cardíaco del recién nacido (RN) por el pulmón. Con el incremento de presión de la aurícula izquierda se favorece el cierre funcional del foramen oval que, en conjunto con la desaparición del *ductus arteriosus* y venoso, establece el funcionamiento en serie del sistema circulatorio, modelo cardiovascular del RN normal y del adulto (Rudolph, 2010).

Todo lo anteriormente descrito, puede verse complicado por hipoxia aguda y/o crónica, la cual se define como la reducción en la presión parcial de oxígeno en la sangre arterial ( $\text{PaO}_2$ ), que altera significativamente los mecanismos que ocurren normalmente en la transición cardiovascular y respiratoria de feto a recién nacido, ya descritas (Abman, 1999).

En grandes alturas ocurre un fenómeno de hipoxia hipobárica que, por el descenso de la presión atmosférica, reduce la presión parcial de oxígeno ambiental, de la fracción inspiratoria de oxígeno ( $\text{FIO}_2$ ), de los alvéolos y de la sangre arterial y venosa de los sujetos expuestos a alta altitud, llegando eventualmente a hipoxia tisular (MINSAL, 2012).

Teniendo en consideración que varios lugares en el mundo se encuentran en grandes alturas (2.500 m.s.n.m.o más) (Moore *et al.*, 1998), se ha hecho necesario el estudio de los mecanismos en que la hipoxia crónica materna, embrionaria, fetal y neonatal, afecta el crecimiento y desarrollo de los diferentes órganos y sistemas, entre ellos los sistemas cardiovascular y respiratorio. Dichos estudios realizados en ovinos, han comprobado que la hipoxia crónica de altura afecta el desarrollo fetal y al igual que en los humanos, los recién nacidos son de bajo peso, siendo un 26-29% más livianos comparados con corderos RN a nivel del mar (Parraguez *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2010). A nivel del mar también la prevalencia de la restricción del crecimiento intrauterino en humanos es alta, de 5 a 10% de los RN vivos (Herrera *et al.*, 2014).

Por otra parte, la hipoxia hipobárica crónica genera una importante vasoconstricción e hipertensión arterial en la circulación pulmonar y, a mediano y largo plazo, hay remodelamiento de los vasos pulmonares, reduciendo aún más el lumen vascular y aumentando la resistencia vascular pulmonar (Herrera *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2011). Más aún, cuando hay una hipoxia generalizada, como en la gran altitud, hay aumentos excesivos y globales de la resistencia pulmonar mantenidos en el tiempo, los que llevan a hipertrofia ventricular derecha, eventualmente falla cardíaca y muerte (Herrera *et al.*, 2010).

Actualmente, los tratamientos disponibles (en uso clínico o experimentalmente) en adultos humanos, son los derivados sintéticos de prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) (*Iloprost*, *Epoprostenol*, *Treprostinil*); antagonistas de receptores de endotelina 1 (ET-1) (*Bosentan*, *Sitaxsentan*, *Ambrisentan*); inhibidores de fosfodiesterasa 5 (PDE5) (*Sildenafil*, *Taladafil*) y bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje (tipo L) (*Verapamil*) (Humbert *et al.*, 2004;

Abman, 2007; Galié *et al.*, 2010). Sin embargo, en neonatos, las terapias clínicamente permitidas por la *Food and Drug Administration* (FDA), USA, para tratar la hipertensión pulmonar, son el óxido nítrico inhalatorio (iNO) y la oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO, por acrónimo en inglés), como última instancia. El problema con el iNO, es que aproximadamente el 30-50% de los niños RN no responden y, en general, no hay mejoras significativas en la letalidad con este tratamiento (Walsh-Sukys *et al.*, 2000). Más aún, el iNO es muy costoso (Walsh-Sukys *et al.*, 2000) y no está disponible en todas las regiones de Chile. Con respecto a la ECMO, es el último recurso terapéutico y que presenta una alta morbilidad y mortalidad además de diversas complicaciones y está sólo disponible en 2 Unidades de Tratamiento Intensivo Neonatal en Santiago, Chile (Abman *et al.*, 2007).

En la circulación pulmonar, el NO endógeno es producido en las células endoteliales a partir del aminoácido L-arginina, por la acción de la enzima NO-sintasa endotelial (eNOS). El NO producido actúa sobre su receptor intracelular, la enzima guanilciclase soluble (sGC), estimulándola y generando cGMP a partir de guanosín trifosfato (GTP) y produciendo vasodilatación de los vasos pulmonares, como veremos más adelante. En los corderos crónicamente hipóxicos e hipertensos pulmonares de Putre, la expresión de eNOS y la síntesis de NO está paradójicamente aumentada, pero hay una notable reducción de la expresión proteica y función de la sGC (Herrera *et al.*, 2008), con disminución del cGMP en el pulmón, por lo tanto, se reduce la capacidad de vasodilatación pulmonar y favorece la vasoconstricción e hipertensión pulmonar (Herrera *et al.*, 2007).

Por esta razón y las limitadas opciones de tratamiento, varios estudios realizados en los laboratorios de Fisiopatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (ICBM, Instituto de Ciencias Biomédicas), utilizan un modelo animal basado en el cordero recién nacido para evaluar fármacos que puedan reemplazar al NO en el tratamiento de la hipertensión pulmonar. Para ello, se han empleado animales concebidos, gestados y nacidos en la localidad de Putre, Región de Arica y Parinacota (3600 m.s.n.m) (Llanos *et al.*, 2003).

En el presente estudio se utilizó el péptido natriurético auricular, ANP, que fue inicialmente aislado de tejido cardíaco, particularmente en la aurícula derecha (Flynn *et al.*, 1983). El ANP tiene 28 aminoácidos (aa) y es parte de los péptidos natriuréticos (NPs), junto con el péptido natriurético cerebral (BNP) de 32 aa y el péptido natriurético C, de 22 aa (CNP). El ANP es

el péptido natriurético principal, que actúa sobre el corazón, vasos sanguíneos y sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) (Tolsa *et al.*, 2002). Este péptido estimula a su receptor, la guanilil ciclasa particulada A (pGC-A), ubicada en la membrana celular, a diferencia de la sGC que se ubica en el citoplasma, ambas enzimas generan cGMP a partir del GTP y actúan como mensajero intracelular. La pGC-A, está presente en el corazón, en las células musculares lisas, en el endotelio de los vasos sanguíneos y en los riñones. La unión del ANP al receptor pGC-A desencadena los principales efectos fisiológicos en los sistemas cardiovascular y endocrino (Schlossmann y Desch, 2011). El ANP se une a pGC-A con gran afinidad, mientras la afinidad de BNP por este receptor es menor (Schlossmann y Desch, 2011). El cGMP estimula la proteína kinasa dependiente de cGMP-1 (PKG-1), que a su vez provoca vasodilatación de los vasos pulmonares. La vasodilatación ocurre porque PKG-1 fosforila a la fosfatasa de la cadena liviana de miosina (MLCP) en dos serinas, activando a esta enzima, que defosforila la cadena liviana de la miosina, provocando así la dilatación vascular pulmonar. Además, la PKG-1 activa el canal de potasio sensible a calcio de alta conductancia ( $BK_{Ca}$ ), hiperpolarizando la célula muscular lisa y relajando el vaso sanguíneo (Gao y Raj, 2010). Además, inhibe los canales de  $Ca^{+2}$  tipo L, evitando la entrada de  $Ca^{+2}$  a la célula y la depolarización de ésta (Lincoln *et al.*, 2005). Contemporánea a la acción vasodilatadora, ANP produce inhibición de la síntesis de aldosterona y la secreción de renina, provocando diuresis y natriuresis, por lo tanto, juega un papel importante en la regulación de la presión arterial y del volumen sanguíneo (Nishikimi *et al.*, 2006).

El ANP produce una relajación en el músculo liso vascular *in vitro* y vasodilatación periférica *in vivo*. La hipotensión sistémica asociada a ANP, es la consecuencia de una vasodilatación arteriolar, con reducción de la resistencia vascular periférica, del volumen circulante, del retorno venoso, de la precarga y del gasto cardiaco (Adnot *et al.*, 1988). Sin embargo, la función de los NPs en el pulmón no se conoce bien y menos aún en el pulmón neonatal. El ANP produce vasodilatación de las arterias pulmonares de corderos recién nacidos. Además, es importante hacer notar que, a concentraciones molares equivalentes, el ANP es un vasodilatador más potente que NO en el cordero recién nacido *ex vivo* (utilizando arterias y venas del pulmón con un diámetro de 3.0-3.5 y 2.5-3,0 mm respectivamente, cortadas en anillos de 3 mm) (Tolsa *et al.*, 2002). Es posible entonces especular que el ANP y los NPs puedan tener un rol central en el control de la circulación pulmonar neonatal. Este eventual



rol para los NPs es consistente con las concentraciones plasmáticas de NPs, que aumentan marcadamente en los primeros días de vida en corderos sanos, sugiriendo fuertemente que ANP y BNP pueden tener un importante papel fisiológico en los cambios cardiorespiratorios que tienen lugar al nacer (Mannarino *et al.*, 2010). Inmediatamente después de nacer, ANP y BNP son secretados desde la aurícula y ventrículo derecho y podrían actuar directamente en la circulación pulmonar, dilatando las arterias pulmonares pequeñas y de resistencia, disminuyendo la resistencia vascular y la presión arterial pulmonar, jugando un papel en la transición cardiorespiratoria del feto al recién nacido. Más aún, estas observaciones llevan a plantear que el ANP dilata los vasos pulmonares *in vivo* y podría servir como un regulador del tono vascular pulmonar y como eventual fármaco para el tratamiento de la hipertensión pulmonar del RN.

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto del ANP sobre variables fisiológicas de ovinos recién nacidos con hipertensión arterial pulmonar, inducida por las grandes alturas (3.600 m.s.n.m.), tales como presión arterial pulmonar (PAP) (media, sistólica y diastólica), gasto cardíaco (GC) y frecuencia cardíaca (FC); presión arterial sistémica (PAS) (media, sistólica y diastólica). Adicionalmente, se calculó la resistencia vascular pulmonar (RVP) y la resistencia vascular sistémica (RVS). Estas mediciones se realizaron en condiciones basales en grandes altitudes y también durante un episodio de hipoxia sobreimpuesta, tomando en cuenta la alta frecuencia que estos episodios tienen en el curso del síndrome de hipertensión arterial del recién nacido.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

La administración del péptido natriurético auricular (ANP) provoca una disminución de la resistencia vascular y de la presión arterial pulmonar, por dilatación de los vasos pulmonares *in vivo* y podría servir como un eventual fármaco para el tratamiento de la hipertensión pulmonar arterial del recién nacido.

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de ANP en las variables fisiológicas cardiovasculares de ovinos recién nacidos hipertensos pulmonares en grandes altitudes (3.600 m.s.n.m).

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la dosis necesaria de ANP para disminuir la hipertensión arterial pulmonar, sin alterar significativamente la presión arterial sistémica.
2. Determinar el efecto de ANP sobre PAP, RVP, GC, PAS, FC, RVS, durante siete días de tratamiento.
3. Determinar el efecto del tratamiento de ANP, sobre las variables antes mencionadas, durante un episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta, posterior al tratamiento.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los objetivos abordados en este estudio están enmarcados dentro de los procedimientos y objetivos del Proyecto Fondecyt Regular 1140647, titulado *After years of “NO” treatment, we seek for yes treatments: Soluble and particulate guanylyl cyclases could say yes to treat pulmonary arterial hipertensión of the newborn*, los que fueron visados y aprobados por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA N° 0643 FAMUCH) (Anexo 1).

### **Lugar y animales**

Esta investigación se llevó a cabo en la Estación Experimental Putre, INCAS (acrónimo en inglés de, *Internacional Center for Andean Studies*) de la Universidad de Chile, a 3.600 m.s.n.m, Región de Arica y Parinacota, Chile.

Se utilizaron catorce corderos recién nacidos (dos controles para prueba de dosis, seis tratados con ANP y seis controles tratados con el vehículo NaCl 0.9%), con hipertensión pulmonar inducida por la altura (Herrera *et al.*, 2008), de aproximadamente tres días de edad, gestados y nacidos en el sector, con pesos entre 3,5 y 5,5 kg aproximadamente. Cada recién nacido fue alimentado con leche materna, proporcionada *ad libitum* por su respectiva madre, las cuales fueron alimentadas con alfalfa y agua *ad libitum*.

### **Procedimiento quirúrgico**

Recién nacidos de tres y cuatro días de edad, con pesos entre 3,5 y 5,5 kg, fueron premedicados con Atropina 1% (0,04 mg/kg) intramuscular, posteriormente anestesiados con una asociación de Ketamina (5-10 mg/kg) y Xilacina (0,5 mg/kg) ambas inyectadas intramuscularmente. Adicionalmente, se utilizó Lidocaina 2% subcutánea en los lugares de incisión; junto a esto se administró Licuamicina LA (10 mg/kg) como profilaxis de infecciones y Metamizol Sódico (10 mg/kg) para el manejo del dolor del post operatorio (Herrera *et al.*, 2007).

Luego fueron sometidos a una cirugía que consistió en disecar la vena yugular externa, realizando una incisión a nivel del cuello del recién nacido, con el fin de introducir un catéter cardiopulmonar *Swan-Ganz*, que por esta vía se ubicó en la arteria pulmonar. El catéter fue

preparado y llenado con NaCl 0,9% antes de la cirugía y una vez posicionado, el *Swan-Ganz* fue heparinizado y luego guardado en una bufanda con bolsillo fijada al cuello del animal mientras duró la investigación.

En paralelo al procedimiento descrito, se disecaron la arteria y vena femoral, realizando una incisión a nivel de la cara interna del miembro posterior izquierdo, introduciendo un catéter de polivinilo en cada vaso, ubicando los catéteres en la arteria aorta abdominal y vena cava inferior respectivamente. Luego, los catéteres fueron dirigidos subcutáneamente mediante un trócar, hacia el flanco izquierdo, donde se exteriorizaron y se guardaron en un bolsillo adherido a la piel del animal, manteniéndolos ahí los días que duró la investigación (Herrera *et al.*, 2007).

Cada cirugía tuvo una duración de aproximadamente 45 minutos, la recuperación total del cordero tuvo una duración de una a dos horas, los cuales una vez despiertos, fueron llevados a un corral donde estaba su madre, lugar donde se alimentaron y se les permitió recuperarse el resto del día. Al día siguiente, comenzaron los tratamientos de ANP o vehículo (NaCl 0,9%).

#### **Administración de ANP o vehículo (NaCl 0,9%)**

#### **Determinación de la dosis usada**

En primera instancia, se utilizaron dos recién nacidos para definir la dosis de ANP que fue administrada a los seis corderos del grupo ANP. Se probaron diferentes concentraciones por vía sistémica (10 a 50 µg/kg) o por vía *Swan-Ganz* (2,4 a 5 µg/kg), todas solubilizadas en 10 mL de solución salina (NaCl 0,9%). El objetivo fue determinar la menor concentración posible para disminuir la mPAP sin alterar la mSAP, ya sea por vías intrapulmonar, por medio de un catéter *Swan-Ganz* o sistémica, vía vena femoral (Adnot *et al.*, 1988; Abman y Accurso, 1991). Finalmente, la dosis elegida fue 5 µg/kg, administrada por el catéter *Swan-Ganz*.

## Administración diaria de ANP

Con la dosis determinada anteriormente y siguiendo la misma vía de administración, procedimos a implementar el protocolo de aplicación que se describirá a continuación.

Los catéteres, instalados en la cirugía, se conectaron a un transductor de presión, previamente calibrado y éste a un programa de adquisición de datos (PowerLab/LabChart 7), conectado a un computador. En él, se visualizó y se registró la presión arterial pulmonar (PAP) (media, sistólica y diastólica) utilizando el catéter *Swan-Ganz*. Además, a través del catéter *Swan-Ganz* se midió el gasto cardiaco por termodilución, administrando 3 mL de NaCl 0,9% a 4°C, promediando tres determinaciones. Además, se midió la presión arterial sistémica (PAS) (media, sistólica y diastólica) y frecuencia cardiaca (FC) a través del catéter en la arteria aorta abdominal (Herrera *et al.*, 2007).

Asimismo, se calculó la resistencia vascular pulmonar (RVP) y resistencia vascular sistémica (RVS), utilizando de las siguientes ecuaciones (Dvorkin y Cardinali *et al.*, 2003):

$$\text{RVP (mmHg)} = \frac{\text{mPAP} - \text{presión de enclavamiento vascular pulmonar (mmHg)}}{\text{Gasto cardiaco (ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1})}$$

$$\text{RVS (mmHg)} = \frac{\text{mSAP} - \text{presión aurícula derecha (mmHg)}}{\text{Gasto cardiaco (ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1})}$$

El registro se realizó por 85 min, de los cuales fueron 15 min basales, 10 min de infusión de ANP (administrado por una bomba de infusión a una velocidad de 1 mL por min) y 60 min de recuperación después de la administración de ANP.

Durante los 7 días de tratamiento, el registro cardiopulmonar de 15 min se llevó a cabo antes de empezar cada infusión diaria, de manera que el día 1 corresponde al valor basal (sin tratamiento), justo antes del inicio de la infusión de ANP o vehículo. En los días subsiguientes, lo medido equivale a valores 24 hrs después de la infusión del día anterior.

Por otra parte, cada 15 min se tomó una muestra sanguínea (arterial aórtica y venosa de arteria pulmonar), de 0,2 mL aproximadamente, a través de los catéteres respectivos para evaluación

de pH, PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, [Hb], saturación de la Hb por O<sub>2</sub>, contenido de O<sub>2</sub> (IL-Synthesis 25, Instrumentation Laboratories, mediciones corregidas a 39°C). Este procedimiento fue repetido por siete días, por la duración del síndrome de hipertensión pulmonar del recién nacido y la posibilidad terapéutica con ANP durante su evolución. Cabe destacar que además se realizaron estudios morfométricos en cada recién nacido a primera hora en la mañana, antes de las mediciones cardiorrespiratorias, con el fin de monitorear el estado fisiológico y posibles anormalidades que pudiesen presentarse. Se midió peso, diámetro biparietal, altura torácica, diámetro abdominal, largo corona cola y largo de fémur.

### **Experimento de hipoxia aguda isocápnica sobreimpuesta**

Al día ocho del post operatorio, los corderos fueron sometidos a un experimento de hipoxia aguda sobreimpuesta a la hipoxia existente por la altitud. Éste se basa en un protocolo de 90 min divididos en tres periodos: uno basal de 30 min (respirando aire ambiental), 30 minutos de hipoxia sobreimpuesta y 30 min de recuperación. Para inducir la hipoxia sobreimpuesta, se ubicó una bolsa de polietileno sobre la cabeza del cordero, por la cual se hizo fluir una mezcla de gases (~ 10% de O<sub>2</sub>, 2-3% de CO<sub>2</sub> en N<sub>2</sub>), con un flujo de ~ 20 L/min, con el fin de reducir la PO<sub>2</sub> aórtica a ~30 mmHg (28-32) (Herrera *et al.*, 2007). Luego de los 30 min de hipoxia, la bolsa se retiró y el animal volvió a respirar el aire ambiental con registros de 30 min en el período de recuperación.

Durante el procedimiento se registró la presión arterial pulmonar (PAP) (media, sistólica y diastólica), frecuencia cardiaca (FC), gasto cardiaco (GC), y la presión arterial sistémica (PAS) (media, sistólica y diastólica); incluyendo el cálculo de la RVP y RVS. Además, cada 15 min se tomaron muestras sanguíneas (arterial aórtico y venosa de arteria pulmonar), para evaluar pH, PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, [Hb], saturación de la Hb por O<sub>2</sub>, contenido de O<sub>2</sub> (IL-Synthesis 25, Instrumentation Laboratories, mediciones corregidas a 39°C).

### **Análisis estadístico de los datos**

Los valores fueron expresados como medias  $\pm$  E.E.M. Las diferencias entre las medias fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, además de ANOVA anidado a modo confirmatorio (datos no mostrados) y las diferencias por el test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias fueron consideradas como significativas cuando  $p \leq 0,05$  (Glantz y Slinker, 2001).

Para estos análisis estadísticos, se utilizaron los programas SigmaStat 3.5 y Stata 8.0.

## RESULTADOS

### Determinación de la dosis de ANP

Se utilizaron dos recién nacidos para determinar la dosis de ANP, que disminuyera la mPAP con la menor disminución de la mSAP. Cada dosis fue evaluada durante 3 períodos: basal, por 15 min (sin tratamiento), infusión de ANP durante 10 min y recuperación con duración variable de acuerdo al efecto provocado por la dosis, hasta lograr la recuperación completa del animal.

Se administró ANP, preparado como se menciona en materiales y métodos, vía sistémica (vena cava inferior), con dosis de 10, 25 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en 10 min de infusión. Las dosis de 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , no mostraron cambios significativos en ninguna de las 2 variables mencionadas. La dosis de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  disminuyó significativamente tanto la mPAP como la mSAP, siendo estos resultados indeseados para fines de esta memoria, ya que solo se busca disminuir la mPAP.

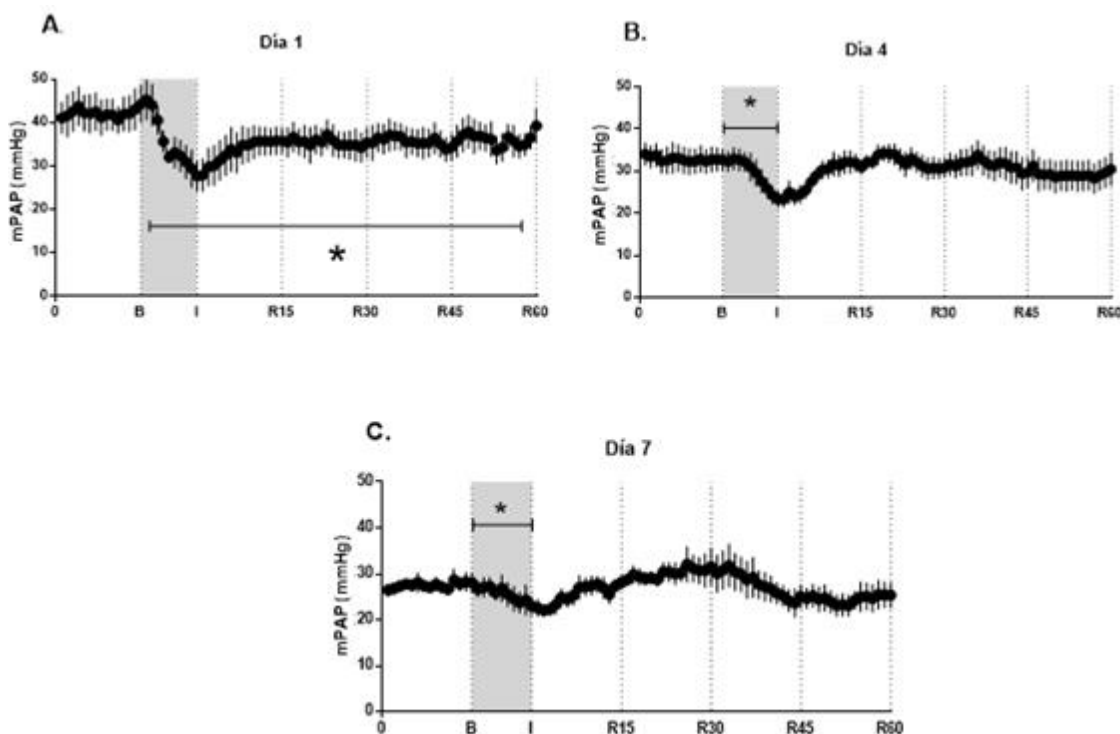
Con los resultados anteriormente descritos, se decidió administrar ANP directamente al territorio pulmonar (vía *Swan Ganz*), con el fin de atenuar o no provocar el efecto que se obtuvo con la vía sistémica. Se administró dosis menores de 2, 5 y 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en 10 min, de las cuales la primera no mostró cambios significativos ni en la mPAP ni en la mSAP, la segunda sí mostró los cambios esperados y concordantes con la hipótesis, disminuyendo solo la mPAP, sin modificar significativamente la mSAP. La última prueba solo se realizó a modo de confirmación teniendo menos efecto que la anterior dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Por lo tanto, en el tratamiento con ANP para disminuir la hipertensión arterial pulmonar neonatal, se administró una dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en 10 min vía arteria pulmonar durante 7 días, evaluando diariamente las variables cardiovasculares (mPAP, mSAP, GC, FC, RVS y RVP y gasometría arterial). En general, cuando se administra el ANP por vía sistémica hay un mayor compromiso en la circulación sistémica. En contraste, cuando se administra por vía intrapulmonar, los efectos indeseados en la circulación sistémica son menores.



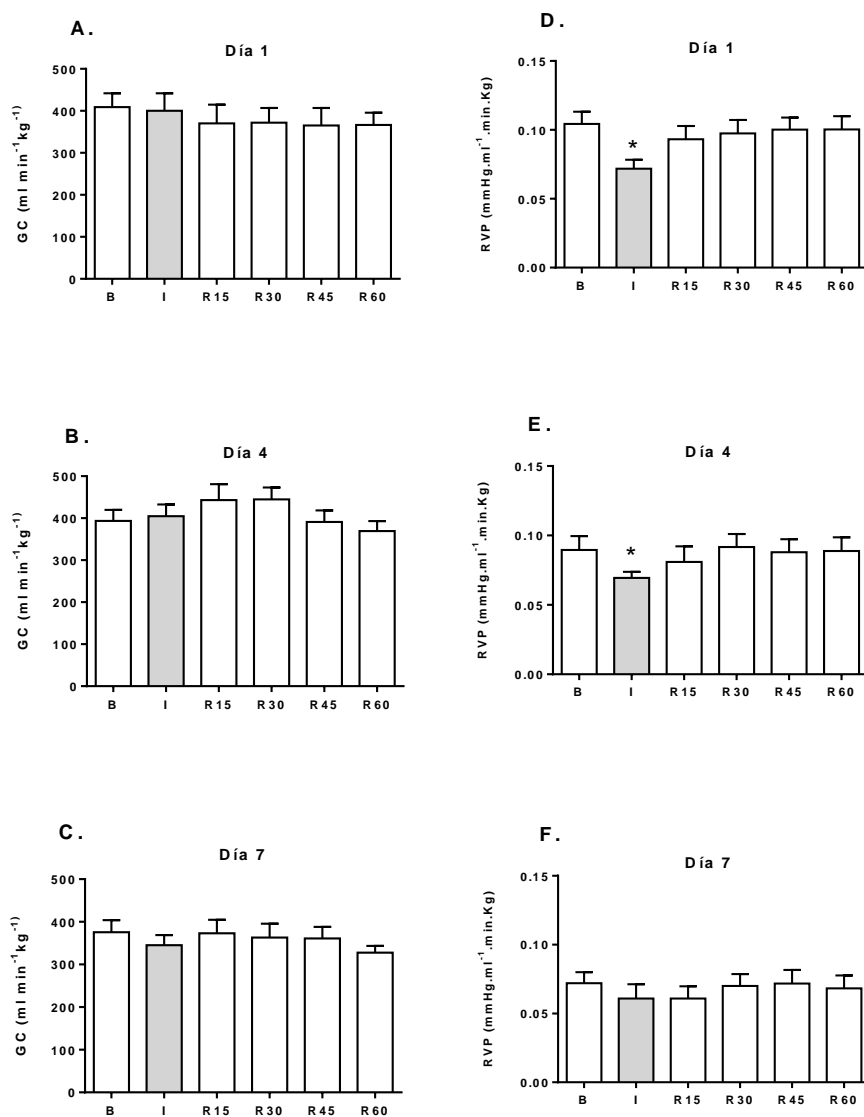
## Efecto agudo de la infusión de ANP sobre variables cardiovasculares

Los corderos presentaron una hipertensión arterial pulmonar importante presentando una mPAP de ~ 41 mmHg el primer día postcirugía. Durante los dos primeros días de tratamiento la mPAP disminuyó significativamente durante el periodo de infusión, manteniendo este cambio durante todo el período de recuperación. La Figura 1 A, muestra el comportamiento agudo de la administración de ANP en el primer día de administración, en los 6 corderos RN. Sin embargo, desde el tercer día en adelante este cambio en la mPAP es significativo solamente durante el periodo de infusión de ANP, logrando una recuperación de los valores basales a los 15 min de recuperación aproximadamente (Figura 1, B, C). Cabe destacar que la mPAP basal es menor en el transcurso de los 7 días de tratamiento, así como la disminución de mPAP en el periodo de infusión de ANP.



**Figura 1: Efecto agudo de la infusión diaria de ANP (5  $\mu$ g/kg en 10 minutos) sobre la presión arterial pulmonar media (mPAP) en corderos gestados en grandes altitudes. A. Día 1; B. Día 4; C. Día 7. B. Periodo basal (15 min); I. Periodo de infusión (gris) (10 min); R. Periodo de recuperación (15, 30, 45, 60 min). Valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM. \*,  $p < 0,05$ .**

El GC en los corderos RN que fueron tratados con ANP no se modificó al momento de la administración del fármaco, en ninguno de los 7 días de tratamiento (Figura 2, A, B, C). En contraste, la RVP tuvo una disminución aguda sólo durante la infusión, que fue significativa durante el día 1 y 4 (Figura 2, D, E, respectivamente). En el día 7 la RVP no presentó modificaciones en ningún momento del estudio (Figura 2, F).

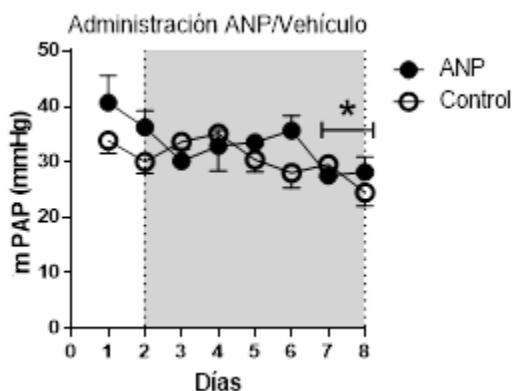


**Figura 2. Efecto agudo de la infusión diaria de ANP (5 µg/kg en 10 minutos) sobre el gasto cardiaco (GC; A, B, C) y la resistencia vascular pulmonar (RVP; D, E, F) en corderos gestados en grandes altitudes. B. Periodo basal (15 min); I. Periodo de infusión (gris) (10 min); R. Periodo de recuperación (15, 30, 45, 60 min). Valores se expresan como promedio ± EEM. \*, p < 0,05 Grupo ANP.**

Con respecto a los registros sistémicos, mSAP, RVS y FC no tuvieron cambios significativos durante los 7 días de tratamiento (datos no mostrados).

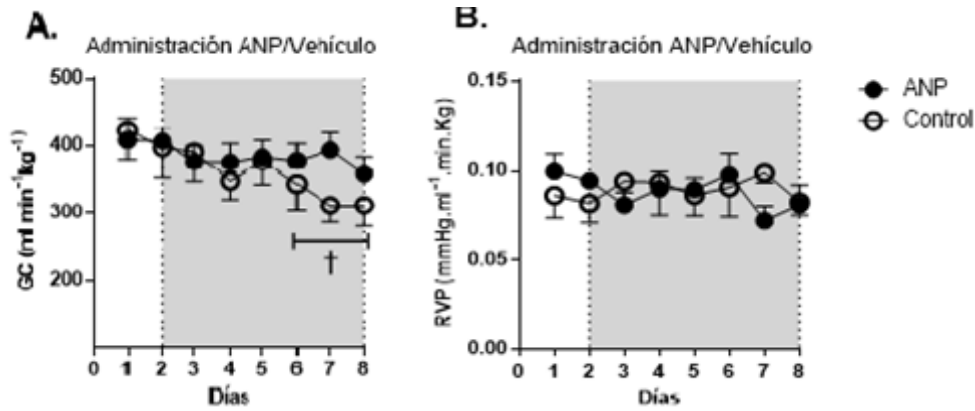
### **Efecto del tratamiento con ANP y vehículo (NaCl 0,9%) en variables cardiovasculares basales**

La mPAP en el grupo control (NaCl 0,9%) se mantuvo sin cambios significativos a lo largo de los 7 días de tratamiento. Sin embargo, el grupo tratado con ANP disminuyó la mPAP significativamente durante los 2 últimos días del estudio, en aproximadamente 30%, con respecto al día sin tratamiento (día 1). No existen diferencias significativas entre el grupo tratado con ANP y el grupo tratado con el vehículo (Figura 3)



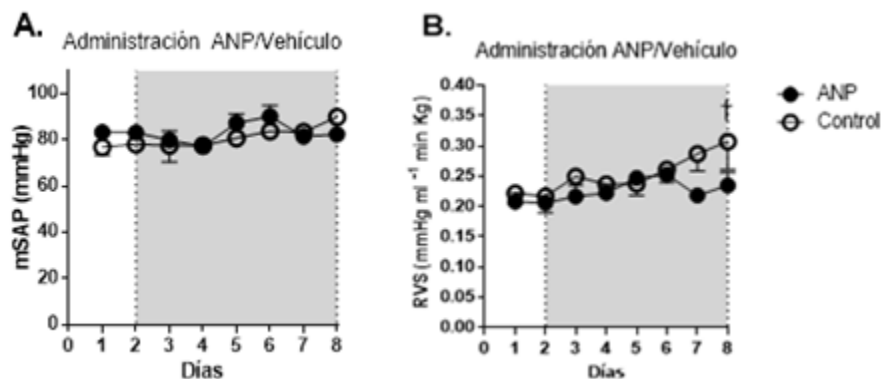
**Figura 3. Efecto de la infusión diaria de ANP o de vehículo (NaCl 0,9%) sobre la presión arterial pulmonar media (mPAP) en corderos gestados en grandes altitudes.** Las mediciones se realizaron antes de cada infusión de ANP o del vehículo diariamente, por lo que día 1 corresponde al valor basal de mPAP justo antes del inicio del tratamiento, lo gris corresponde a los días con el tratamiento. Valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM. \*,  $p < 0,05$  grupo ANP.

El GC en el grupo control disminuyó aproximadamente 24% en los últimos tres días con respecto al día sin tratamiento (día 1). RVP se mantuvo sin cambios significativos a lo largo del estudio. En el grupo tratado con ANP, ambas variables mencionadas se mantuvieron constantes a lo largo de los 7 días de tratamiento. No existen diferencias significativas entre el grupo tratado con ANP y el grupo tratado con el vehículo (Figura 4 A, B).



**Figura 4. Efecto de la infusión diaria de ANP o de vehículo (NaCl 0,9%) sobre el gasto cardiaco (GC) y la resistencia vascular pulmonar (RVP) en corderos gestados en grandes altitudes.** Las mediciones se realizaron antes de cada infusión de ANP o del vehículo diariamente, por lo que día 1 corresponde al valor basal de GC y RVP justo antes del inicio del tratamiento, lo gris corresponde a los días con el tratamiento. Valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM. †,  $p < 0,05$  grupo control.

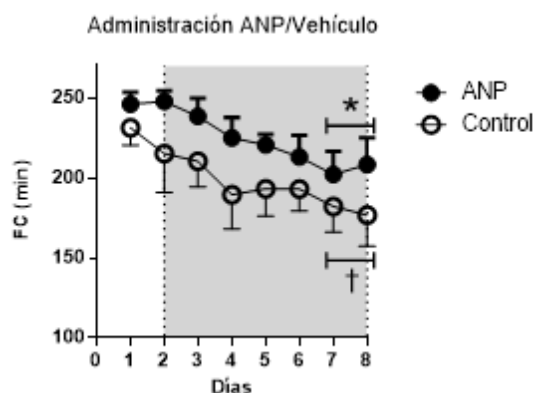
Respecto a registros sistémicos, la mSAP en el grupo control se mantuvo sin cambios significativos durante los 7 días de tratamiento. Sin embargo, la RVS en el grupo control mostró un aumento en el día 8 con respecto al día sin tratamiento (día 1). En el grupo tratado con ANP no se presentaron cambios significativos en ninguna de las variables mencionadas. No existen diferencias significativas entre el grupo tratado con ANP y el grupo tratado con el vehículo (Figura 5 A, B).



**Figura 5. Efecto de la infusión diaria de ANP o de vehículo (NaCl 0,9%) sobre la presión arterial sistémica media (mSAP) y la resistencia vascular sistémica (RVS) en corderos gestados en grandes altitudes.** Las mediciones se realizaron antes de cada infusión de ANP o del vehículo diariamente, por lo que día 1 corresponde al valor basal de mSAP y RVS justo

antes del inicio del tratamiento, lo gris corresponde a los días con el tratamiento. Valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM. †,  $p < 0,05$  grupo control.

Los registros de FC, tanto en el grupo control como en el tratado con ANP, tuvieron una disminución significativa los días 7 y 8 ( $\sim 23 \pm 3\%$  vehículo y  $\sim 17 \pm 3\%$  ANP) en comparación con el día sin tratamiento (día 1). No existen diferencias significativas entre el grupo tratado con ANP y el grupo control (Figura 6).



**Figura 6. Efecto de la infusión diaria de ANP o de vehículo (NaCl 0,9%) sobre la frecuencia cardíaca (FC) en corderos gestados en grandes altitudes.** Las mediciones se realizaron antes de cada infusión de ANP o del vehículo diariamente, por lo que día 1 corresponde al valor basal de FC justo antes del inicio del tratamiento, lo gris corresponde a los días con el tratamiento. Valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM. \*,  $p < 0,05$  grupo ANP. †,  $p < 0,05$  grupo control.

## Determinación de la respuesta cardiopulmonar y gasometría arterial durante un episodio de hipoxia aguda isocápnic sobreimpuesta posterior al tratamiento

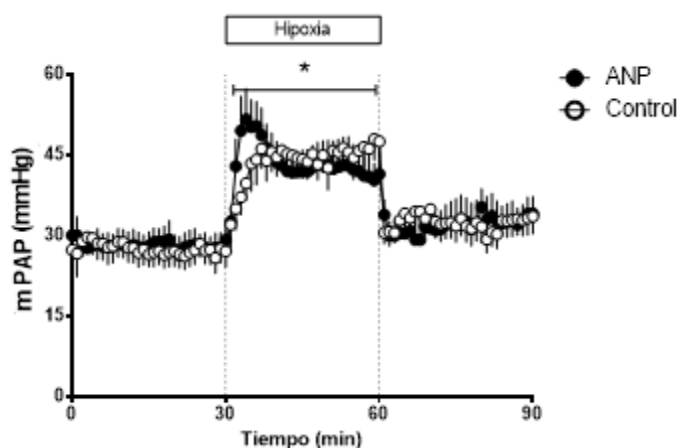
Se evaluó la respuesta de los animales a un episodio de hipoxia aguda isocápnic sobreimpuesta un día después de finalizar el tratamiento, para determinar si este induce cambios en la respuesta vasoconstrictora pulmonar.

Con respecto a los gases arteriales el pH y pCO<sub>2</sub> se mantuvieron constantes durante todo el experimento en ambos grupos, la pO<sub>2</sub> y SaO<sub>2</sub> presentaron valores similares intergrupo durante el periodo basal y recuperación, y disminuyen similarmente durante la hipoxia aguda sobreimpuesta, aunque los valores de SaO<sub>2</sub> entre tratados y controles son significativamente distintos. Los corderos tratados con ANP tuvieron un leve pero significativo aumento de la [Hb] durante la hipoxia aguda sobreimpuesta, con respecto al valor basal y de la recuperación. No existen diferencias significativas entre el grupo tratado con ANP y el grupo control (Tabla 1).

**Tabla 1. Gasometría arterial durante hipoxia aguda isocápnic sobreimpuesta.** pH, Presión parcial de oxígeno (pO<sub>2</sub>), Presión parcial de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>), Saturación de oxígeno (SaO<sub>2</sub>), Concentración de hemoglobina (Hb). B. Tiempo basal (30 min); H. Hipoxia sobreimpuesta (30 min); R. Tiempo de recuperación (30 min). Valores se expresan como promedio ± EEM. #, p < 0,05 intergrupo (control vs ANP).\*, p < 0,05 vs basal y recuperación intragrupo.

		B	H	R
pHa	Control	7,42 ± 0,01	7,45 ± 0,01	7,44 ± 0,02
	ANP	7,45 ± 0,02	7,43 ± 0,03	7,43 ± 0,03
pO <sub>2</sub> (mmHg)	Control	50,8 ± 1,0	29,8 ± 0,3 *	46,9 ± 1,6
	ANP	52,2 ± 1,4	28,9 ± 0,5 *	49,7 ± 3,3
pCO <sub>2</sub> (mm Hg)	Control	34,8 ± 1,3	32,9 ± 1,6	31,2 ± 1,7
	ANP	34,1 ± 2,3	33,4 ± 0,5	31,0 ± 1,3
SaO <sub>2</sub> (%)	Control	73,2 ± 1,0	47,6 ± 2,0 #	75,7 ± 1,2
	ANP	75,3 ± 2,2	40,3 ± 2,5	74,3 ± 3,4
Hb (g dl <sup>-1</sup> )	Control	10,8 ± 0,8	10,9 ± 0,8	10,4 ± 0,8
	ANP	10,6 ± 0,5	11,5 ± 0,7 *	10,6 ± 0,8

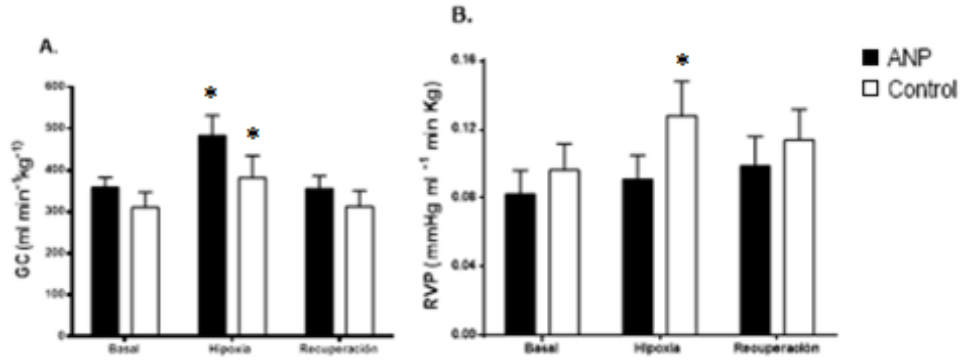
Los registros de mPAP basales y en recuperación en ambos grupos son similares. Sin embargo, durante el periodo de hipoxia aguda, se observó un aumento de mPAP en ambos grupos, pero el grupo tratado con ANP mostró un aumento de esta variable los primeros minutos del experimento en comparación con el grupo control, aunque este aumento no es significativo (Figura 7).



**Figura 7. Efecto de la hipoxia aguda sobreimpuesta en corderos gestados en grandes altitudes tratados previamente con ANP o vehículo (NaCl 0,9%) sobre la presión arterial pulmonar media.** Valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM. \*,  $p < 0,05$  vs basal y recuperación intragrupo.

El gasto cardiaco en condiciones basales fue similar en ambos grupos y durante el experimento de hipoxia aguda sobreimpuesta, éste aumentó en ambos grupos. En el periodo de recuperación ambos grupos disminuyen esta variable, sin existir diferencias significativas entre los grupos vehículo y ANP en todos los periodos (Figura 8 A).

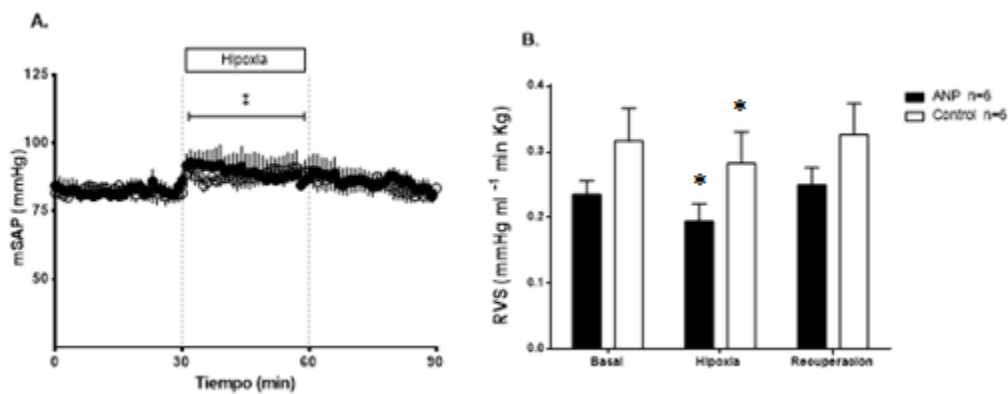
La RVP en el grupo control tuvo un aumento en el experimento de hipoxia aguda sobreimpuesta, disminuyendo en el periodo de recuperación, sin embargo y en franco contraste con el grupo tratado con ANP, la RVP se mantuvo sin cambios significativos durante las tres etapas del experimento. No hubo diferencias significativas entre el grupo tratado con ANP y el grupo control (Figura 8 B).



**Figura 8. Efecto de la hipoxia aguda sobreimpuesta en corderos gestados en grandes altitudes tratados previamente con ANP o vehículo (NaCl 0,9%) sobre el gasto cardiaco (GC) y la resistencia vascular pulmonar (RVP).** Valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM. \*,  $p < 0,05$  vs basal y recuperación.

La mSAP en el grupo control se mantiene sin variaciones significativas durante todo el experimento de hipoxia aguda sobreimpuesta. No obstante, en el grupo tratado con ANP existió un aumento durante la hipoxia en comparación con los períodos basal y recuperación. No existen diferencias significativas entre el grupo tratado con ANP y el grupo tratado con el vehículo (Figura 9 A).

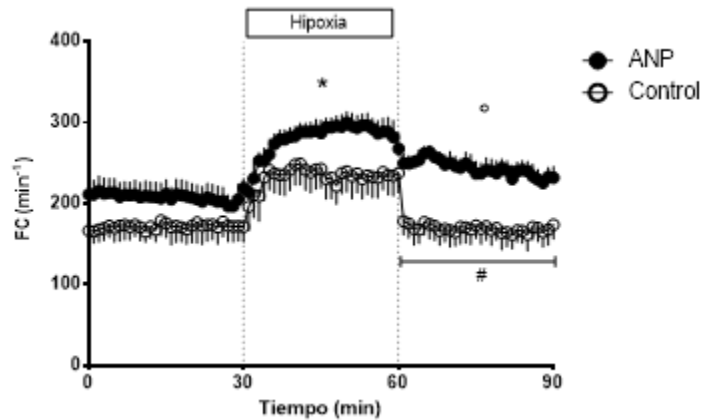
La RVS en ambos grupos presenta una disminución en el periodo de hipoxia, no encontrando diferencias significativas entre el grupo ANP vs. vehículo (Figura 9 B).



**Figura 9. Efecto de la hipoxia aguda sobreimpuesta en corderos gestados en grandes altitudes tratados previamente con ANP o vehículo (NaCl 0,9%) sobre la presión arterial sistémica media (mSAP) y la resistencia vascular sistémica (RVS).** Valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM. ‡,  $p < 0,05$  vs basal intragrupo (ANP) \*,  $p < 0,05$  vs basal y recuperación intragrupo.



Con respecto a la FC, el grupo control, presentó un aumento solo en el periodo de hipoxia, manteniendo valores similares tanto en el periodo basal como en el de recuperación. Sin embargo, en el grupo tratado con ANP, las diferencias se presentan en todas las etapas, sin lograr una recuperación completa del experimento de hipoxia aguda sobreimpuesta, existiendo una diferencia significativa en la recuperación versus los periodos basales y de hipoxia. Hubo una diferencia significativa en el período de recuperación intergrupos, en donde el grupo ANP se mantuvo aumentado con respecto al grupo control (Figura 10).



**Figura 10. Efecto de la hipoxia aguda sobreimpuesta en corderos gestados en grandes altitudes tratados previamente con ANP o vehículo (NaCl 0,9%) sobre la frecuencia cardiaca (FC).** Valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM. #,  $p < 0,05$  intergrupo (control vs ANP); \*,  $p < 0,05$  H vs B y R intragrupo. °,  $p < 0,05$  B vs R intragrupo (ANP).

## DISCUSIÓN

En la presente memoria de título, se planteó la hipótesis que señala que la administración del péptido natriurético auricular (ANP) provocaría una disminución de la resistencia vascular y de la presión arterial pulmonar, por dilatación de los vasos pulmonares *in vivo* y podría servir como un eventual fármaco para el tratamiento temprano de la hipertensión pulmonar arterial del recién nacido. Con los resultados obtenidos se demostró que la administración aguda de ANP provocó una disminución de la presión arterial pulmonar (PAPm) de corderos gestados y nacidos en altura (3.600 m.s.n.m.) con hipertensión pulmonar (sobre 25 mmHg) (Simoneau *et al.*, 2013), la cual es significativa durante la infusión y recuperación del fármaco, solo los dos primeros días de tratamiento. Desde el día tres en adelante este cambio en la PAPm es significativo sólo durante el periodo de infusión de ANP, logrando una recuperación a los 15 minutos aproximadamente desde el término de la administración. Estos resultados en corderos recién nacidos, sugieren que ANP podría ser utilizado como eventual fármaco de emergencia a una crisis hipertensiva arterial pulmonar, con una respuesta vasodilatadora aguda la que generaría tiempo extra para la búsqueda de una alternativa de tratamiento a esta patología de manera crónica, probando la veracidad parcial de la hipótesis.

Diversos estudios han utilizado otros modelos, tales como ratas adultas, cerdos de diversas edades, fetos de oveja en el último tercio de gestación y humanos con enfermedades cardiacas, entre otros, en donde las dosis utilizadas van desde 0,1 µg/kg hasta 100 µg/kg, por diversas vías de administración (Adnot *et al.*, 1988; Abman *et al.*, 1991; Ishicura *et al.*, 2007; Baliga *et al.*, 2008; Morimoto *et al.*, 2008). Por lo tanto, no nos basamos solo en un autor para definir la dosis utilizada en este estudio, se probaron varias alternativas acorde a las características de nuestro modelo, hasta dar con la que nos entregaba un resultado concordante con la hipótesis, utilizando una dosis alta de 50 µg/kg administrado vía vena femoral (llegando a la aorta abdominal), la que provocó una gran disminución de la presión a nivel sistémico, hasta llegar a la dosis utilizada de 0,5 µg/kg vía arteria pulmonar que logró disminuir la PAPm sin mayores alteraciones en el lecho sistémico.

Además, estudios en nuestro modelo animal están validados por otros investigadores del laboratorio, que buscan también encontrar un tratamiento alternativo para la hipertensión pulmonar del recién nacido, pero con otros fármacos, de tal manera que los protocolos de

cirugía, toma de muestras y experimentos de hipoxia están lo suficientemente estudiados. Ejemplos de ello, con la utilización del mismo modelo, son los trabajos de Herrera *et al.*, 2014 y Torres *et al.*, 2015, con la utilización de Melatonina, una hormona con propiedades antioxidantes, que no logró una reducción de la mPAP, pero sí una reducción del estrés oxidativo, mejoras de la función vascular y morfología de pequeñas arterias pulmonares. Parrau *et al.*, 2013 y Castillo *et al.*, 2016, con la utilización de 2-aminoetildifenilborinato (2-APB), un bloqueador de *store operated channels* (SOC), canales catiónicos permeables a calcio que producen vasoconstricción, lograron revertir parcialmente la hipertensión arterial pulmonar, disminuyendo el tono vasoconstrictor y el remodelamiento arterial pulmonar patológico, pero disminuyendo parcialmente el gasto cardiaco. López *et al.*, 2016, administrando Fasudil, un inhibidor de las ROCKs, demostró una disminución de la mPAP, sin disminución de la presión arterial sistémica, con reducción del remodelamiento vascular, entre otros hallazgos. Ebersperger, 2011, con la utilización de Hemina, un inductor de hemooxigenasa y potencial vasodilatador vía cGMP, revirtió parcialmente la hipertensión arterial produciendo este efecto al séptimo día de tratamiento aproximadamente y también el remodelamiento vascular pulmonar. Todos estos potenciales tratamientos para la hipertensión arterial del recién nacido, no tienen un efecto agudo inmediato para tratar una crisis hipertensiva pulmonar como el descrito en el tratamiento con ANP por sus propiedades vasodilatadoras.

La disminución de la respuesta a ANP durante el tratamiento diario podría estar vinculada al hecho de que una exposición crónica a los péptidos natriuréticos podría reducir la actividad de los receptores de los mismos (NPR-A NPR-B), a través de una internalización (*down-regulation*) o una desfosforilación de la proteína quinasa de los receptores llamada desensibilización homóloga (Pandey, 2001; Potter y Hunter, 2001). Estas posibilidades aún no están del todo resueltas y se necesitan más estudios para conocer los mecanismos que puedan explicar estos resultados. Este fenómeno podría deberse también a que la actividad de PDE5, enzima que degrada cGMP, se incrementa por altos niveles de cGMP (inducidos por el tratamiento planteado), lo que podría explicar, en parte, la tolerancia que se desarrolla en la altura a los tratamientos antihipertensivos con el óxido nítrico (Herrera *et al.*, 2008) y eventualmente ANP. Un incremento de la actividad de la PDE5, lo sugiere un estudio de Baliga *et al.*, 2008, donde utilizó un inhibidor de la PDE5 (sildenafil) en combinación con ANP, demostrando que una combinación de ambos produce una vasodilatación pulmonar,

sin producir una hipotensión sistémica en ratas, mejorando los índices de gravedad de la enfermedad. También en corderos hipertensos pulmonares nacidos y criados en grandes altitudes geográficas (3600 msnm), sildenafil produjo una disminución de la presión arterial pulmonar (Herrera *et al.*, 2008).

En cuanto al promedio diario de la resistencia vascular pulmonar (RVP) de los corderos, este mostró una disminución significativa solo en el periodo de infusión del fármaco, sin ser concordante con la disminución de la mPAP, lo que supone que influyó en el resultado, sin mostrar significancia en la RVP en el periodo de recuperación. Sin embargo, un aspecto interesante de destacar es que la RVP de los recién nacidos tratados con ANP en el periodo de hipoxia aguda sobreimpuesta no aumentó, en franco contraste con los animales controles que tienen el clásico aumento de la RVP con la hipoxia. La ausencia de la vasoconstricción típica que tienen las arterias pulmonares pequeñas y de resistencia del pulmón, a la drástica disminución de oxígeno (Kuhr *et al.*, 2012), podría deberse a que ANP estaría disminuyendo la capa media muscular de las arterias, como ocurre con otros fármacos (Parrau *et al.*, 2013; López *et al.*, 2016) o creando un mecanismo en donde se vea desensibilizada la respuesta contráctil de las mismas (López *et al.*, 2016). Esto se corroborará en próximos estudios de morfología y *ex vivo* realizados por el laboratorio.

Los animales tratados con ANP durante el periodo de hipoxia aguda sobreimpuesta, tuvieron un aumento mayor de hemoglobina, en comparación a los animales controles, lo que podría ser un efecto combinado de la disminución de la presión parcial de oxígeno por el experimento de hipoxia aguda que causa una hemoconcentración de la sangre y por ende un aumento en los valores de hemoglobina, efecto que se observa también en estudios anteriores del laboratorio, que muestran un aumento en las concentraciones de hemoglobina en un experimento de hipoxia aguda sobreimpuesta (Llanos *et al.*, 1995; Herrera *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2010; Parrau *et al.*, 2013; López *et al.*, 2016). Estos resultados sumados a que el ANP *per se* provoca un aumento en la permeabilidad vascular, produciendo un aumento en el hematocrito y concentración de hemoglobina (Potter *et al.*, 2006). Este fenómeno es también descrito por Sabrane *et al.*, (2005) que comprobó, en ratones con el receptor GC-A intacto, que una administración de ANP exógeno causa un aumento significativo e inmediato en el hematocrito, indicando una aguda salida de volumen plasmático al espacio extracelular.

Por otra parte y en el mismo estudio, no se obtuvo efecto con una infusión de ANP en ratones en donde el receptor GC-A fue inactivado. Con lo anteriormente señalado, se podría suponer que el significativo aumento en la concentración de hemoglobina en los animales tratados con ANP es una sumatoria de los días de tratamiento, más la hipoxia aguda causada a los recién nacidos.

La frecuencia cardiaca durante el experimento de hipoxia aguda sobreimpuesta en los corderos tratados con ANP, muestran siempre una respuesta ligeramente más elevada que el grupo control. Aunque en el periodo basal e hipoxia, esta diferencia no es estadísticamente significativa, pero sí lo es en el periodo de recuperación. Los corderos RN tratados con ANP no logran recuperarse a la misma velocidad que los controles, a pesar de que el gasto cardiaco en estos animales se comporta de la misma forma que en el grupo control, aunque con valores levemente más altos, sin presentar una diferencia significativa entre ambos. Un estudio realizado por Kazuhiro *et al.*, (2000), demostró que los péptidos natriuréticos aumentan significativamente el contenido de catecolaminas intracelulares. Además de resultados aún no publicados del laboratorio que demuestran que se produce un significativo aumento de la concentración de catecolaminas en los corderos crónicamente hipóxicos sometidos a una hipoxia sobreimpuesta, lo que sugeriría una estimulación importante del sistema simpático y los receptores beta-1 miocárdicos, provocando el aumento de la frecuencia cardiaca en los corderos del grupo ANP.

En resumen, el tratamiento agudo con ANP provocó una disminución también aguda de la presión arterial pulmonar y el tratamiento crónico con el fármaco produjo una ausencia de la importante vasoconstricción pulmonar durante el episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta.

## **CONCLUSIÓN**

En este estudio se logró atenuar la hipertensión pulmonar en corderos recién nacidos gestados en las grandes altitudes mediante una infusión aguda del ANP, este tratamiento disminuyó la presión arterial pulmonar sin alterar los valores sistémicos, como se describió en la hipótesis, solo los dos primeros días de tratamiento. Además de no modificar la resistencia vascular pulmonar en un episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta.

Esto nos abre nuevas posibilidades a las estrategias farmacológicas ya existentes que hacen frente a esta patología, ya que el ANP se podría utilizar como un tratamiento en las crisis hipertensivas pulmonares que ocurren en el síndrome de hipertensión pulmonar del recién nacido, dando tiempo de buscar una alternativa definitiva a esta patología.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ABMAN, SH.; ACCURSO, FJ.** 1991 Sustained fetal pulmonary vasodilation with prolonged atrial natriuretic factor and GMP infusions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 260: H183-H192.

**ABMAN, SH.** 1999 Abnormal vasoreactivity in the pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Rev.* 20: e103-e109.

**ADNOT, S.; CHABRIER, PE.; BRUN-BUISSON, C.; VIOSSAT, I.; BRAQUET, P.** 1988. Atrial natriuretic factor attenuates the pulmonary pressor response to hypoxia. *J Appl Physiol* 65: 1975-1983.

**DVORKIN, M.; CARDINALI, D.** 2001. Bases fisiológicas de la práctica médica, Best & Taylor. 13° Edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires, Argentina; Caracas, Venezuela; Bogotá, Colombia; Madrid, España; Sao Paulo, Brasil. 308 p.

**FLYNN, T.; BOLD, M.; BOLD, A.** 1983. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 859–865.

**GAGNON, R.** 2003. Placental insufficiency and its consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1:S99-107.

**GAO, Y.; RAJ, U.** 2010. Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and the newborn. *Physiol Rev* 90: 12191-1335.

**GLANTZ, SA.; SLINKER, BK.** 2001. Repeated Measures In Primer of Applied Regression and Analysis of variance (2nd ed.). MzGraw-Hill, Inc. New York. pp. 418-507.

**HERRERA, EA.; PULGAR, VM.; RIQUELME, RA.; SANHUEZA, EM.; REYES, VR.; EBENSPERGER, G.; PARER, JT.; VALDEZ, EA.; GIUSSANI, DA.; BLANCO, CE.; HANSON, MA.; LLANOS, AJ.** 2007 High altitude chronic hypoxia during gestation

and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R2234–R2240.

**HERRERA, E.; EBENSPERGER, G.; KRAUSE, B.; RIQUELME, R.; REYES, R.; CAPETILLO, M.; GONZALEZ, S.; PARER, J.; LLANOS, A.** 2008. Sildenafil Reverses Hypoxic Pulmonary Hypertension in Highland and Lowland Newborn Sheep. *Pediatric Research*. 63: 169–175.

**HERRERA, EA.; RIQUELME, RA.; EBENSPERGER, G.; REYES, RV.; ULLOA, CE.; CABELLO, G.; KRAUSE, BJ.; PARER, JT.; GIUSSANI, DA.; LLANOS, AJ.** 2010. Long-term exposure to high-altitude chronic hypoxia during gestation induces neonatal pulmonary hypertension at sea level. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 299: R1676-84.

**HERRERA, E.; EBENSPERGER, G.; RIQUELME, R.; DIAZ, M.; REYES, V.; TORRES-FARFAN, C.; LLANOS, A.** 2011. Respuesta cardiopulmonar a cambios de oxigenación en recién nacidos de ovejas de diferentes altitudes. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 26: 53-63.

**HERRERA, EA.; KRAUSE, BJ.; EBENSPERGER, G.; REYES, RV.; CASANELLO, P.; PARRA-CORDERO, M.; LLANOS, AJ.** 2014. The placental pursuit for an adequate oxidant balance between the mother and the fetus (Article 149). *Front Pharmacol* 5: 1-10.

**KUHR, FK.; SMITH, KA.; SONG, MY.; LEVITAN, I.; YUAN, JX.** 2012. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1546–H1562.

**LLANOS, A.; RIQUELME, R.; MORAGA, F.; CABELLO, G.; PARER, J.** 1995. Cardiovascular responses to graded degrees of hypoxaemia in the llama fetus. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 549-552.

**LLANOS, A.; RIQUELME, R.; SANHUEZA, E.; HANSON, M.; BLANCO, M.; BLANCO, C.; PARER, J.; HERRERA, E.; PULGAR, V.; REYES, R.; CABELLO, G.** 2003. The fetal llama versus the fetal sheep: different strategies to withstand hypoxia. *High Alt Med Biol*. 4: 193-202.



**MANNARINO, S.; GAROFOLI, F.; CERBO, RM.; PEROTTI, G.; MONGINI, E.; CODAZZI, C.; CIARDELLI, L.; TINELLI, C.; DESILVESTRI, A.; STRONAH, M.** 2010. Cord blood, perinatal BNP values in term and preterm newborns. Arch Dis Child Fetal Neonatal. Ed 95: F74.

**MINSAL.** 2011. Síndrome de Dificultad Respiratoria en el recién nacido. <en línea> <<http://web.minsal.cl/portal/url/item/7222754637f78646e04001011f014e64.pdf>> [consulta: 08-08-2015].

**MINSAL.** 2012. Guía Técnica Sobre Exposición Ocupacional a Hipobaría Intermitente Crónica por Gran Altitud. <en línea>. <[http://web.minsal.cl/sites/default/files/guia\\_hipobaria\\_altitud.pdf](http://web.minsal.cl/sites/default/files/guia_hipobaria_altitud.pdf)> [consulta: 08-08-2015].

**MOORE, LG., NIERMEYER, S., ZAMUDIO, S.** 1998. Human adaptation to high altitude: regional and life-cycle perspectives. Am J Phys Anthropol. 27: 25-64.

**NISHIKIMI, T.; MAEDA, N.; MATSUOKA, H.** 2006. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. Cardiovasc Res. 69: 318-328.

**PARRAGUEZ, V.; ATLAGICH, M.; DIAZ, R.; BRUZZONE, M.; BEHN, C.; RAGGI L.A.** 2005. Effect of hypobaric hypoxia on lamb intrauterine growth: comparison between high-and low-altitude native ewes. Reprod Fertil Dev. 17: 497-505.

**PENALOZA, D., ARIAS-STELLA, J.** 2007. The heart and pulmonary circulation at high altitudes: Healthy highlanders and chronic mountain sickness. Circulation. 115: 1132-1146.

**RUDOLPH, A.** 1979. Fetal and Neonatal Pulmonary Circulation Ann. Rev. Physiol. 41: 383-395.

**RUDOLPH, A.** 2010. Congenital cardiovascular malformations and the fetal circulation. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 95: F132-F136.

**SABRANE, K.; KRUSE, M.; FABRITZ, L.; ZETSCHKE, B.; MITKO, D.; SKRYABIN, B.; ZWIENER, M.; BABA, H.; YANAGISAWA, M.; KUHN, M.** 2005. Vascular

endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J. Clin. Invest.* 115: 1666–1674.

**SCHLOSSMANN, J.; DESCH M.** 2011. IRAG and novel PKG targeting in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H672-H682.

**SIMONNEAU, G; GATZOULIS, MA; ADATIA, I; CELERMAJER, D; DENTON, C; GHOFRANI, A; GOMEZ SANCHEZ, MA; KRISHNA-KUMAR R; LANDZBERG, M; MACHADO, RF; OLSCHEWSKI, H; ROBBINS, IM; SOUZA, R.** 2013. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62(25 Suppl): D34-D41.

**TOLSA, JF.; GAO, Y.; SANDER, FC.; SOUICI, AC.; MOESSINGER, A.; RAJ JU.** 2002. Differential responses of newborn pulmonary arteries and veins to atrial and C-type natriuretic peptides. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H273-H280.

**WALSH-SUKYS, M.; TYSON, J.; WRIGHT, LL.; BAUER, C.; KORONES, S.; STEVENSON, D.; VERTER, J.; STOLL, B.; LEMONS, J.; PAPILE, L.; SHANKARAN, S.; DONOVAN, E.; EHRENKRANZ, R.; FANAROFF, A.** 2000. Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn in the Era Before Nitric Oxide: Practice Variation and Outcomes. *Pediatrics.* 105: 14–20.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Certificación del Comité de Bioética sobre la Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITE DE BIOETICA SOBRE  
INVESTIGACION EN ANIMALES

### CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *“After years of “NO” treatment, we seek for YES treatments: soluble and particulate Guanylyl Cyclases could say YES to treat pulmonary arterial hypertension of the newborn”* cuyo investigador responsable es el **Dr. Jorge Aníbal Llanos Mansilla** no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (**Protocolo CBA# 0643 FMUCH**).

El Dr. Llanos se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto enviado al concurso FONDECYT Regular 2014.

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales; 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “**PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO**”(www.med.uchile.cl/normas/indice.html) después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*

  
Dr. Carlos Valenzuela Y.  
Presidente

Santiago, 01 de Octubre de 2013