

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN POSTNATAL DE  
MELATONINA SOBRE LA FUNCIÓN Y ESTRUCTURA  
CARDÍACA EN NEONATOS DE OVEJA GESTADOS Y  
NACIDOS EN HIPOXIA CRÓNICA**

**RENÉ ANDRÉS CANTARIÑO PÉREZ**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOPATOLOGÍA**

**Director de Tesis: Prof. Dr. Emilio A. Herrera V.**

**2017**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato**

**RENÉ ANDRÉS CANTARIÑO PÉREZ**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Fisiopatología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día viernes 31 de marzo de 2017**

**Prof. Dr. Emilio Herrera**

**Director(a) de Tesis**

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Rodrigo Castillo**

**Prof. Dra. Paulina Donoso**

**Presidenta Comisión**

**Prof. Dra. Julia Guerrero**

**Prof. Dr. Víctor Reyes**

*René Cantariño Remedy,  
el mejor padre y amigo que ha existido,  
ahora y siempre vives en mi corazón.*

## AGRADECIMIENTOS

- **Dr. Emilio Herrera**, por la paciencia, constante orientación en el desarrollo de este trabajo y, sobre todo, por ser un gran maestro.
- **Bq. Mg., Alejandro González-Candia**, por su dedicación en enseñarme las técnicas de análisis y por transportarme a los primeros años de pregrado a través del uso de material de laboratorio.
- **Ing. Mg., Esteban Figueroa**, por su especial apoyo en la realización de los análisis durante los momentos difíciles de la vida.
- **Sra. Mireya Delgado**, por hacer de la histología una obra de arte.

## **ÍNDICE**

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
Hipoxia crónica de altura e hipertensión pulmonar	<b>8</b>
Hipertensión pulmonar del recién nacido	<b>9</b>
Especies reactivas del oxígeno	<b>15</b>
Sistemas antioxidantes	<b>16</b>
Estrés oxidativo	<b>17</b>
Hipoxia, estrés oxidativo y falla ventricular en HTPRN	<b>18</b>
Estrategias terapéuticas y antioxidantes: rol de melatonina	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
<b>DETERMINACIONES</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO</b>	<b>60</b>

## RESUMEN

La transición cardiopulmonar del recién nacido es vital al nacimiento. En la hipertensión pulmonar del recién nacido (HTPRN) esta adaptación se ve comprometida, generando un aumento crónico de la postcarga del ventrículo derecho (VD) debido a una excesiva vasoconstricción pulmonar hipóxica. La persistencia de este fenómeno genera un remodelamiento cardíaco maladaptativo, principalmente a nivel parietal y septal, e insuficiencia cardíaca que determinan una alta morbimortalidad al recién nacido. El tratamiento de la HTPRN se ha enfocado principalmente en intentar revertir la vasoconstricción pulmonar, sin embargo, la efectividad del mismo es relativamente baja. Esto podría explicarse en parte por el insuficiente conocimiento sobre los mecanismos responsables de la falla ventricular sumado al escaso abordaje terapéutico de los cambios en la estructura y función del corazón. Estudios previos han evidenciado que el desarrollo de estrés oxidativo/nitrosativo (EON) tiene un rol importante en la fisiopatología de la HTPRN, sin embargo, su impacto a nivel cardíaco no ha sido estudiado. Melatonina, una neurohormona con acción *scavenger* de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno y capacidad de aumentar las enzimas antioxidantes, ha mostrado revertir los cambios anatómicos y funcionales del pulmón en la HTPRN. Pusimos a prueba la hipótesis que los cambios de estructura y función cardíaca en la HTPRN están relacionados con EON, y que melatonina es capaz de revertir dichos cambios. Diez neonatos de oveja gestados y nacidos en hipoxia hipobárica (INCAS, Putre, 3600 m) fueron divididos en grupo control (CN,  $n = 5$ ) y tratado (MN,  $n = 5$ ), a los cuales se les administró vehículo o melatonina (1 mg/kg/día oral), respectivamente. Los tratamientos se administraron entre los días 4 y 12 de vida, período en el cual se registraron diariamente variables hemodinámicas para el análisis de la función cardíaca (gasto y variabilidad cardíaca). Al final de dicho período, se obtuvieron las muestras para el estudio comparativo macro y microscópico de la estructura cardíaca, así como la medición de marcadores de EON (nitrotirosina y 4-hidroxinonenal) y expresión de proteínas antioxidantes (SOD, catalasa y GPx) en VD. Desde el punto de vista funcional, el grupo MN mostró un aumento del gasto cardíaco hacia el final del período de tratamiento, sin una clara diferencia en índices de variabilidad cardíaca entre ambos grupos. Estructuralmente, el grupo MN mostró menores valores de área miocárdica en la cavidad y pared del VD y septum interventricular, respecto del grupo CN. Finalmente, el grupo MN mostró una mayor expresión de catalasa en el tejido ventricular respecto del grupo CN, sin embargo, no se evidenciaron diferencias en los marcadores de EON entre los grupos. Concluimos que melatonina podría favorecer la reversión de los cambios estructurales cardíacos propios de HTPRN, así como mejorar la función ventricular.

## ABSTRACT

The cardiopulmonary transition at birth is a vital phenomenon. In the persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) this aspect is compromised, generating an excessive afterload to the right ventricle (RV) due to an increased hypoxic pulmonary vasoconstriction. As this persists, the RV develops a maladaptive hypertrophy, mainly basal and septal, and failure with an increased morbimortality. Treatment of PPHN has focused mainly on reverting vasoconstriction, with low effectiveness. This could be explained due to lack of knowledge on the pathophysiology of heart failure and lack of attention of this issue on treatment. There is evidence of the role of oxidative/nitrosative stress (ONS) on the pathophysiology of PPHN, however, there are no studies of the impact in the heart. The neurohormone melatonin has shown a *scavenger* effect over reactive oxygen/nitrogen species and the ability to increase level of antioxidant enzymes. It has also shown beneficial in reverting the anatomical and functional changes in PPHN. With this evidence we tested the hypothesis that ONS is related to the changes in structure and function of the heart in PPHN, and that melatonin is capable to revert these changes. Ten neonate sheep that were gestated and borned in hypobaric hypoxia (INCAS, Putre, 3600 m) were divided in control (CN,  $n = 5$ ) and treatment (MN,  $n = 5$ ) groups, with the administration of vehicle or melatonin (1 mg/kg/d PO), respectively. Intervention occurred within 4 and 12 days after birth, where hemodynamic variables were recorded to estimate cardiac function (cardiac output [CO] and variability [CV]). At the end of the period, samples were obtained for macro and microscopic study of the heart, and also for markers of ONS (nitrotyrosine and 4-hydroxynonenal) and expression of antioxidant enzymes (SOD, catalase and GPx) on RV. Functionally, the MN group showed an increase in CO by the end of the period, with no changes in CV. Structurally, the MN group showed a decrease in myocardial area of the RV cavity, wall and interventricular septum. Finally, the MN group showed an increase in the expression of catalase in RV with no differences in ONS between groups. With these results we postulate that melatonin could revert the structural changes in PPHN, with a beneficial effect on its function.

## **INTRODUCCIÓN**

### **HIPOXIA CRÓNICA DE ALTURA E HIPERTENSIÓN PULMONAR**

La composición de gases de nuestra atmósfera es relativamente constante, con aproximadamente 78% nitrógeno, 21% oxígeno, y 1-2% de otros gases y vapor de agua. No obstante, las presiones parciales están directamente relacionadas con la presión barométrica, la cual disminuye a medida que aumenta la altura geográfica. Dentro de estos cambios, la variable más importante está constituida por la disminución de la presión parcial de oxígeno, la cual determina un impacto negativo sobre la salud humana cuando se superan los 2500 m de altura (Burtscher, 2010). Según reportes demográficos, aproximadamente 140 millones de personas a nivel mundial residen de forma permanente (Moore et al, 1998), y más de 100 millones de personas visitan anualmente localidades situadas por sobre los 2500 m (Burtscher et al, 2001).

La disminución de la presión parcial de oxígeno o hipoxia hipobárica gatilla una serie de respuestas en el sistema circulatorio. Mientras que el territorio arteriolar sistémico responde con una vasodilatación que favorece el flujo sanguíneo tisular, el territorio pulmonar sufre el fenómeno inverso conocido como Vasoconstricción Pulmonar Hipóxica (VPH). La VPH es una respuesta rápida y reversible de la circulación pulmonar, que cuando ocurre a nivel local o regional permite redireccionar el flujo sanguíneo hacia áreas mejor ventiladas, lo que asegura una mejor relación ventilación/perfusión (Sylvester et al, 2012). Si bien constituye un eficiente mecanismo adaptativo de respuesta ante el estrés hipóxico agudo, cuando dicho insulto hipóxico es global y persistente en el tiempo, se activan mecanismos que contribuyen a la perpetuación de un mayor tono vascular, dando origen a un remodelamiento vascular pulmonar principalmente por hipertrofia e hiperplasia de las células musculares lisas de la capa media arterial (Davies et al, 1986). Esto resulta en un aumento permanente de la presión de arteria



pulmonar o hipertensión pulmonar de altura y, consecuentemente, un aumento de la postcarga del ventrículo derecho (VD) e hipertrofia maladaptativa del mismo (Peñaloza et al, 2007).

Todo esto sitúa a la hipoxia por altura o hipoxia hipobárica como un problema creciente de salud pública a nivel mundial, de lo cual nuestra población andina es la que concentra el mayor foco de atención a nivel latinoamericano.

### **HIPERTENSIÓN PULMONAR DEL RECIÉN NACIDO**

Durante la vida intrauterina, el feto se desarrolla en un ambiente hipóxico relativo, con una presión parcial de oxígeno y saturación arterial de oxígeno promedio en la arteria pulmonar de 18 mmHg y 50% respectivamente (Kiserud, 2005). Estas características, sumado al hecho que la hematosi ocurre a nivel placentario, determinan que la circulación pulmonar posea una alta resistencia vascular pulmonar (RVP) y presión de la arteria pulmonar (PAP), con un bajo flujo sanguíneo, recibiendo menos del 20% del gasto cardíaco combinado (Rasanen et al, 1998). Esto se explica fundamentalmente por una menor capacidad vasodilatadora ante la presencia de oxígeno y a un aumento del grosor de la capa muscular de arteriolas pulmonares. Por lo anterior y desde el punto de vista cardíaco, el grosor de la pared del VD es mayor que en cualquier otra etapa de la vida. Esta particular configuración cardiopulmonar tiene como finalidad derivar la mayor parte del flujo sanguíneo hacia el ventrículo izquierdo (VI) y así hacia la circulación sistémica.

En el momento del nacimiento, la RVP y la PAP sufren un rápido descenso debido a un cambio local en el balance de los mediadores vasoactivos, con aumento y preponderancia de sustancias vasodilatadoras por sobre las vasoconstrictoras (Hislop, 2005). Este fenómeno es el resultado del aumento de oxígeno en el parénquima pulmonar debido a los primeros esfuerzos ventilatorios (Rasanen et al, 1998). Así mismo y en el transcurso de algunas semanas, se

producen cambios anatómicos en la vasculatura pulmonar, con disminución y adelgazamiento de la densidad de las células musculares lisas en las arteriolas, lo que contribuye a perpetuar la caída de la RVP y PAP (Abman, 1999). A nivel cardíaco, este cambio produce una disminución en la postcarga y presión del VD, lo que, sumado al aumento de la presión arterial de la circulación sistémica, favorece el cierre de los cortocircuitos intra y extracardíacos y una disminución progresiva en el grosor de la pared del VD (Guihaire et al, 2015), completándose así la transición cardiopulmonar normal del recién nacido.

En la hipertensión pulmonar del recién nacido (HTPRN) falla la disminución fisiológica de la RVP y PAP al momento del nacimiento, induciendo un remodelamiento vascular pulmonar caracterizado principalmente por un engrosamiento de la capa muscular y una falla en la acción vasodilatadora de las arterias intrapulmonares. A nivel cardíaco, se producirá un remodelamiento maladaptativo del VD, el cual se caracteriza anatómicamente por una hipertrofia excéntrica debido a una elongación de los cardiomiocitos y fibrosis ventricular (Guihaire et al, 2015). Ultraestructuralmente, se observa una reactivación de un fenotipo fetal dentro del ventrículo, caracterizado por una menor expresión génica y síntesis de la cadena pesada de  $\alpha$ -miosina y un aumento compensatorio de la cadena pesada de  $\beta$ -miosina. Adicionalmente, se observa un cambio del metabolismo mitocondrial al glicolítico, una disminución del receptor  $\beta$  adrenérgico y un aumento de la densidad del receptor de angiotensina II tipo 1 (Poels et al, 2015). Estos cambios ventriculares en HTPRN podrían derivar en una insuficiencia cardíaca derecha por dilatación y fibrosis del VD, y global por una alteración de la interdependencia ventricular (Caviedes et al, 2009; Bärtsch et al, 2007), lo que empeora el pronóstico del neonato.

Una de las principales etiologías de la HTPRN es la hipoxia crónica, por ej. la generada durante la gestación y nacimiento en grandes altitudes (Peñaloza et al, 2007), siendo uno de los mecanismos fisiopatológicos más destacados el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) (Brennan et al, 2003; Jankov et al, 2008; Wedgwood et al, 2003), con la consecuente aparición de estrés oxidativo/nitrosativo. Este fenómeno genera una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) derivado del endotelio por desacoplamiento de la eNOS (Grobe et al, 2006) y una disminución de enzimas antioxidantes a nivel pulmonar (Adeleye et al, 2012; Wedgwood et al, 2011). Esto, sumado a un efecto de proliferación de células musculares de arteriolas de este circuito (Crosswhite et al, 2010) conlleva a un aumento de la RVP y de la postcarga del VD. No obstante, los mecanismos que llevan al remodelamiento ventricular en HTPRN aún no han sido del todo dilucidados. Un reporte reciente de ovejas con HTPRN ha descrito un aumento en el tamaño del corazón, con engrosamiento del septum interventricular, y un aumento del depósito del colágeno en la pared del VD (Agger et al, 2016). Estos cambios estructurales se asocian a alteraciones cardíacas funcionales, siendo uno de los elementos más importantes la caída en el gasto cardíaco (GC), lo que contribuye sustancialmente a la morbimortalidad neonatal.

Paralelo a las alteraciones funcionales intrínsecas del corazón, un elemento llamativo dentro de la disfunción ventricular es el rol del sistema nervioso autonómico (SNA). Este sistema está compuesto por dos divisiones: simpática y parasimpática. La primera se relaciona con las respuestas al estrés y está mediada por noradrenalina; la segunda actúa como antagonista de la respuesta anterior y está mediada por la acetilcolina. A nivel cardíaco, el aumento de la actividad simpática genera un aumento de la frecuencia cardíaca (FC), mientras que el aumento de la actividad parasimpática genera una disminución de ésta. Estas diferencias se explican

principalmente por sus efectos antagónicos sobre la pendiente de la corriente de despolarización diastólica  $I_f$  de las células del nodo sinoauricular. La activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos tipo 1 de estas células generan un aumento de la actividad de la adenilil ciclasa, con la consecuente mayor formación de cAMP, el cual al unirse a los canales activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos, favorece las corrientes de entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y en consecuencia la de  $I_f$ , facilitando la despolarización y adelantando la aparición de un potencial de acción (PA). Por otro lado, la activación de los receptores muscarínicos tipo 2 de estas células genera una inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa, disminuyendo las corrientes iónicas de  $I_f$  y su pendiente, retrasando la aparición de un PA (Bartos et al, 2015; Papaioannou et al, 2013).

La variabilidad de la frecuencia cardíaca (VC) constituye uno de los principales elementos que permite evaluar la activación autonómica, ya que traduce los cambios entre cada latido cardíaco en un período determinado de tiempo. Esto refleja la habilidad del corazón para adaptarse a diferentes circunstancias mediante la detección y rápida respuesta a estímulos no predecibles. Así, el análisis de la VC permite evaluar la salud cardíaca global y el funcionamiento del SNA. El análisis de la VC comprende el análisis de tres componentes: el dominio de tiempo, el dominio de frecuencias –constituyendo en conjunto un análisis lineal- y el análisis no lineal de la VC.

El análisis del dominio de tiempo aporta los valores promedio de las variaciones en un determinado período de tiempo. El principal elemento que permite analizar directamente la VC en este dominio es el análisis de la desviación estándar de los intervalos entre latidos (SDNN de sus siglas en inglés). Los parámetros del dominio de frecuencias se estiman mediante análisis espectral, clasificando las variaciones en bandas de frecuencia: Ultra Bajas Frecuencias (ULF

de sus siglas en inglés;  $< 0,017$  Hz), Muy Bajas Frecuencias (VLF de sus siglas en inglés;  $0,017 - 0,04$  Hz), Bajas Frecuencias (LF de sus siglas en inglés;  $0,04 - 1$  Hz) y Altas Frecuencias (HF de sus siglas en inglés;  $0,15 - 0,4$  Hz). Esta clasificación emerge del hecho que el inicio y finalización de la respuesta cronotrópica del corazón a la influencia de las señales de cada división autonómica es diferente. Así, la actividad parasimpática medida como la máxima respuesta cronotrópica y la normalización de la descarga de esta señal, es de 0.5 y 1 segundo, respectivamente. En cambio, para la actividad simpática, los valores de cada variable son de 2 y 20 segundos, respectivamente (Spear et al, 1979). Esto implica que la actividad de la división parasimpática tiene un carácter paroxístico, lo cual es compatible con una banda de alta frecuencia (HF) de descargas de señales, y que la actividad de la división simpática es mucho más lenta, siendo compatible con una banda de baja frecuencia (LF) de descarga de señales. (Berntson et al, 1997). Las descargas en VLF están mayormente relacionadas con alteraciones de la termorregulación y el significado de las descargas en ULF aún es desconocido.

El indicador homólogo a SDNN en este dominio es el poder total de variabilidad (TOTAL POWER [TP] en inglés). Con todo, SDNN y TP reflejan la VC global, para diferenciarla de aquellas de largo y corto plazo. Finalmente, la interacción entre ambas divisiones o balance simpatovagal se puede medir mediante la relación LF/HF.

Estudios previos en adultos han descrito una disminución en la VC en indicadores de ambos dominios en patologías cardíacas crónicas, lo cual se asocia a mayor morbilidad en personas con insuficiencia cardíaca congestiva global (Ponikowski et al, 1997), falla ventricular izquierda aislada (Nolan et al, 1992) y derecha aislada (Fauchier et al, 2004). Así mismo, hay una disminución en indicadores de ambos dominios en hipertensión pulmonar del adulto los cuales se asocian a una peor clase funcional (Bienias et al, 2015), de lo que se puede desprender que

poseen una mayor mortalidad. Todo lo anterior se basa en un predominio en la activación simpática por sobre la parasimpática (Billman et al, 1982). Adicionalmente, este hecho se ha relacionado con la aparición del remodelamiento cardíaco maladaptativo en el VI (Rockman et al, 2002).

Desafortunadamente, en patología pediátrica los estudios de las alteraciones de la VC han sido escasamente profundizados. Únicamente en la sepsis neonatal se ha descrito una alteración de la VC medida como una disminución de la frecuencia cardíaca de reposo -a diferencia con el aumento de ésta observada en adultos- con prolongación de los intervalos RR en recién nacidos de ingresados a unidades de paciente crítico (Griffin et al, 2001), las cuales se asocian a una mayor mortalidad en estos sujetos (Griffin et al, 2004).

Basado en el hecho de que la HTPRN es una patología que requiere manejo en unidades clínicas especializadas, no existen estudios que evalúen los cambios de la VC en esta condición, los eventuales mecanismos responsables ni menos intervenciones terapéuticas relacionadas con este aspecto.

## **ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO, SISTEMAS ANTIOXIDANTES Y ESTRÉS OXIDATIVO**

### ***ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y NITRÓGENO***

Las especies reactivas de oxígeno constituyen radicales libres que poseen al menos un átomo de oxígeno y están representadas por el anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Las ROS en bajas cantidades actúan como moléculas de señalización que median funciones de diferenciación y proliferación celular, inflamación, expresión génica, entre otras (Poljsak, et al, 2013).

El  $\cdot\text{O}_2^-$  surge por la reducción de un electrón del oxígeno mediada por oxidasas e importantemente desde la cadena transportadora mitocondrial de electrones durante la fosforilación oxidativa. Es altamente nucleofílico, con una alta capacidad de interactuar con centros con carga positiva y tiene capacidad oxidativa pudiendo interactuar con dadores de hidrógeno. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se puede generar en cualquier sistema que posea superóxido y oxidasas que transfieren dos electrones al oxígeno molecular. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de generar radicales libres altamente reactivos como resultado de su interacción con metales. No obstante, la acción directa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  involucra el ataque al grupo Hem –lo que genera liberación de Hierro-, inactivación enzimática y oxidación de ADN y lípidos. El  $\text{OH}\cdot$  es una especie altamente agresiva, responsable de la oxidación de gran parte de las biomoléculas (Pisoschi et al, 2015).

Por otro lado, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) constituyen radicales libres que poseen al menos un átomo de nitrógeno y están representadas por el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>). El primero interactúa con el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> para dar origen al peroxinitrito, la RNS más dañina y con mayor capacidad oxidante sobre biomoléculas en su forma protonada (Kohen et al, 2002).

### ***SISTEMAS ANTIOXIDANTES***

Respecto de los sistemas antioxidantes, las superóxido dismutasas (SOD) son la primera línea de defensa contra las ROS/RNS, catalizando la transformación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hay descritas 3 isoformas en mamíferos: Cu-ZnSOD (SOD1), presente en el citosol; MnSOD (SOD2), presente en la matriz mitocondrial; EcSOD (extracelular o SOD3). La ontogenia de la regulación de las enzimas SOD es fundamental para la adaptación del feto frente al ambiente oxigenado luego del nacimiento. El pulmón es la primera barrera para la protección del recién nacido contra los radicales de oxígeno, es por eso que todas las SOD aumentan considerablemente en el pulmón previo al nacimiento en ovejas (Walther et al, 1991) y conejo (Frank et al, 1984). Incluso, la ausencia de SOD2 se ha relacionado con muerte neonatal (Robinson, 1998).

La catalasa (CAT) representa la enzima encargada de la conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua. En tejido de mamíferos la actividad de catalasa es alta en hígado y eritrocitos, relativamente alta en riñones y tejido adiposo, intermedio en pulmones y páncreas, y muy baja en corazón y cerebro (Goyal et al, 2010). No obstante, constituye un importante mecanismo protector contra el daño oxidativo en cardiomiocitos (Chen et al, 2012).



Las glutatión peroxidasas (GPx) son selenoproteínas con una selenocisteína en su centro catalítico y catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o hidroperóxidos orgánicos en agua o alcoholes a expensas de glutatión reducido (GSH). De las principales isoformas, GPx1 se ubica en citosol y mitocondria, GPx2 en el epitelio intestinal, GPx3 en el plasma, mientras que GPx4 protege a membranas del daño oxidativo (Brigelius-Flohe et al, 2013).

### ***ESTRÉS OXIDATIVO***

El estrés oxidativo (EO) se define como la alteración del balance entre la formación de ROS/RNS y la capacidad de contrarrestar los mismos mediante su abanico de compuestos antioxidantes, donde la generación de ROS/RNS supera la capacidad antioxidante. De esta forma, existen dos causas de EO: un aumento neto de ROS/RNS o la disminución de las sustancias antioxidantes endógenas. La importancia del EO está fundada en su directa relación etiopatogénica en enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento (López-Alarcona et al, 2013).

Las fuentes endógenas más importantes de ROS/RNS son aquellas que surgen dentro de las mitocondrias, específicamente en la cadena transportadora de electrones y mediante reacciones catalizadas por la óxido nítrico sintasa. Las fuentes no mitocondriales comprenden la reacción de Fenton, el complejo microsomal citocromo P450, beta-oxidación peroxisomal y la activación de células fagocíticas (Gutteridge, 1993).

La alta reactividad e inestabilidad de ROS/RNS dificultan su medición en sistemas biológicos, es por eso que su análisis se realiza de forma indirecta mediante la determinación de productos finales que resultan de la interacción de estos compuestos con lípidos, proteínas o ADN. El grupo más común como índice de medición de EO son los productos de lipoperoxidación, usualmente ácidos grasos poliinsaturados, que son susceptibles al ataque de ROS/RNS (Pryor

et al, 1991). El daño de lípidos de membrana puede generar cambios en la fluidez y permeabilidad, alteraciones en el transporte de iones e inhibición de procesos metabólicos (Nigam et al, 2000). A su vez, puede dañar a las mitocondrias y generar ROS a partir de ésta (Green et al, 1998), con formación de productos de peroxidación lipídica como 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Parola et al, 1999). Actualmente, 4-HNE es considerado como indicador de EO en muchos procesos patológicos y es el principal aldehído que se forma durante el proceso de lipoperoxidación de ácidos grasos, siendo identificado hace más de tres décadas como un aldehído citotóxico induciendo peroxidación de lípidos microsomales en el hígado (Benedetti et al, 1980). Adicionalmente, RNS generan una modificación postraduccional de proteínas, con nitración de las mismas, dando origen a 3-nitrotirosina. Ésta se ha asociado a una gran variedad de condiciones patológicas, incluida la cardiopatía isquémica en modelos de isquemia/reperfusión miocárdicos en rata (Liu et al, 1997).

### ***HIPOXIA, ESTRÉS OXIDATIVO Y FALLA VENTRICULAR EN HTPRN***

Como se mencionó anteriormente, existe una relación directa entre hipoxia y HTPRN, donde el principal enfoque de estudio está constituido por la relación entre las alteraciones en la estructura y funcionamiento de vasculatura pulmonar con el EO. No obstante, escasa atención ha recibido la adecuación del VD en este escenario a pesar de que se ha identificado el aumento de la RVP como la principal causa de disfunción (Jain et al, 2015). Es más, tanto en la hipertensión pulmonar del adulto (Tabima et al, 2012) como en la disfunción ventricular por otras causas, se ha identificado al EO como un importante mecanismo patogénico de insuficiencia cardíaca (Burgoyne et al, 2012). A la fecha, el estudio de dicha relación en neonatos ha sido escasamente reportada (Torres et al, 2015; Jain et al, 2015), constituyendo una limitante en el conocimiento

integral de la patología y un aspecto necesario de abordar en términos de mejorar las opciones de tratamiento.

### ***ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS Y ANTIOXIDANTES: ROL DE MELATONINA***

Históricamente, el principal objetivo terapéutico para la HTPRN ha consistido en revertir la vasoconstricción pulmonar mediante el uso de oxígeno suplementario y NO inhalado (Nair et al, 2014). Lamentablemente, éstos han mostrado ser efectivos tan solo en 50-60% de los casos (Walsh-Sukys et al, 2000). Esta baja efectividad se podría explicar, en parte, por la ausencia de tratamientos dirigidos al control de ROS/RNS y/o a disminuir el remodelamiento en la circulación cardiopulmonar. Así mismo, la ausencia de ensayos clínicos aleatorizados y multicéntricos, limitan las conclusiones respecto de la efectividad de las nuevas alternativas terapéuticas, como el uso de análogos de prostaciclina, bloqueadores de los receptores de endotelina-1 e inhibidores de la fosfodiesterasa 5 en la HTPRN (Cabral et al, 2013). Finalmente, estos tratamientos plantean dificultades en su disponibilidad y costo en algunas regiones, y no disminuyen el impacto en la salud general a consecuencia de la HTPRN (Eriksen et al, 2009).

Existe evidencia experimental del rol de las sustancias antioxidantes en el control de ROS/RNS en patologías cardiovasculares (Rosenbaugh et al, 2013), siendo la melatonina una hormona que ha demostrado un efecto benéfico demostrado en este escenario (Singh et al, 2014). Esta ejerce su acción mediante mecanismos dependientes e independientes de receptor. Existen 2 receptores de 7 dominios transmembrana para melatonina, ambos asociados a proteína G. El receptor tipo 1 (MT1) es un receptor que inhibe la adenilil ciclasa, con la consecuente disminución de cAMP; el receptor tipo 2 (MT2) ejerce las funciones inversas que el anterior. Ambos se encuentran en gran diversidad de tipos celulares y participan en el control de ROS/RNS al estimular la expresión de enzimas antioxidantes (Rodríguez et al, 2004). Además, se ha descrito un receptor

tipo 3 (MT3) el cual es una enzima perteneciente al grupo de las reductasas, encargadas de disminuir la formación de ROS/RNS mediante la prevención del escape de radicales libres desde los complejos proteicos de la cadena respiratoria; se encuentra distribuida en varios órganos, incluido el corazón. Finalmente, se ha descrito un receptor nuclear perteneciente a la familia RZR/ROR $\alpha$ , cuya principal función está relacionada con la inmunomodulación periférica, el crecimiento celular y la diferenciación ósea (Emet et al, 2016). A estos efectos se le adiciona la función de *scavenger* de ROS/RNS tanto de melatonina como de sus metabolitos (Reiter et al, 2014). Recientemente, en un modelo de HTPRN en ovejas gestadas en altura, la administración postnatal de melatonina (1 mg/kg/día) indujo una rápida y significativa caída de la PAP al inicio del tratamiento, así como una mejor función vasodilatadora y un aumento del diámetro luminal de arteriolas pulmonares después de una semana de tratamiento diario (Torres et al, 2015). Estos hallazgos se asociaron a una disminución de los marcadores de estrés oxidativo y aumento de la capacidad antioxidante enzimática y no enzimática a nivel pulmonar (Torres et al, 2015). De igual forma, la administración prenatal de melatonina en este modelo se asoció con una tendencia al aumento de la expresión génica de las enzimas antioxidantes catalasa y MnSOD en VD de neonatos de oveja gestados y nacidos en hipoxia de altura (Herrera EA, resultados preliminares sin publicar). Lo anterior demuestra que melatonina tiene un efecto antioxidante, mejorando la función vascular pulmonar. En un modelo de embriones de pollo gestados en hipoxia crónica, la administración prenatal de melatonina revirtió el remodelamiento ventricular izquierdo inducido por hipoxia y se asoció a una mejor respuesta a cambios en la frecuencia cardíaca ante la administración de isoprotenerol y carbamilcolina (Itani et al, 2016). Sin embargo, aún se desconoce el efecto de melatonina sobre la función y el remodelamiento del VD en neonatos gestados y nacidos bajo hipoxia crónica, así como el impacto sobre la función y variabilidad cardíaca.

## **HIPÓTESIS**

**La administración postnatal de melatonina mejora la función cardíaca, atenúa el remodelamiento y disminuye los marcadores de estrés oxidativo en el ventrículo derecho de neonatos de oveja con hipertensión pulmonar, gestados y nacidos en altura.**

## **OBJETIVOS**

### ***GENERAL***

**Evaluar el efecto de la administración postnatal de melatonina sobre la función cardíaca, y el remodelamiento, capacidad antioxidante y estrés oxidativo/nitrosativo del ventrículo derecho de neonatos de oveja gestados en hipoxia crónica de altura.**

### ***ESPECÍFICOS***

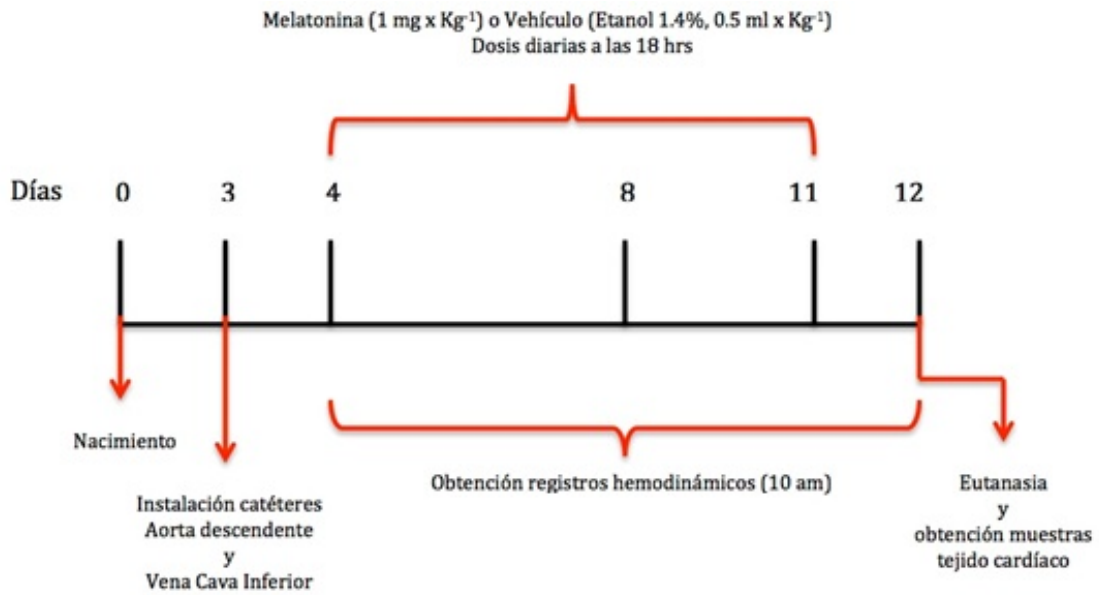
- 1. Determinar variables funcionales cardíacas (variabilidad cardíaca [VC] y gasto cardíaco [GC]) durante el tratamiento postnatal con melatonina.**
- 2. Determinar variables estructurales cardíacas como indicadores de remodelamiento ventricular.**
- 3. Determinar la expresión de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en ventrículo derecho.**
- 4. Determinar los niveles de estrés oxidativo/nitrosativo mediante los marcadores nitrotirosina (NT) y 4-Hidroxinonenal (4-HNE) en ventrículo derecho.**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Todos los manejos animales y experimentos propuestos en este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales (CBA#0398 FMUCH) de la Universidad de Chile y por el Comité asesor de Bioética de FONDECYT (N°018/FONDECYT/Medicina/0097) y se llevaron a cabo según las normas internacionales establecidas en *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health* (NIH Publication No. 85–23, revised 1996).

### ***ANIMALES***

Se utilizó como modelo experimental a recién nacidos de oveja (*ovis aries*) gestados y nacidos en hipoxia hipobárica de altura. Este modelo fue desarrollado y perfeccionado en las instalaciones del Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS), por investigadores del Programa de Fisiopatología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Herrera et al, 2007; Herrera et al, 2008; Herrera et al, 2010; Llanos et al, 2011; Herrera et al, 2011; Parrau et al, 2013; Torres et al, 2015; López et al, 2016; Castillo-Galán et al, 2016). El INCAS se encuentra en Putre (XV Región), a 3600 m de altura, donde se llevó a cabo la gestación y el nacimiento de los neonatos estudiados. El ambiente de hipoxia crónica a esta altura es suficiente para generar cambios en la circulación pulmonar y en la estructura y función ventricular derecha (Herrera et al, 2007, 2008; Torres et al, 2015). A partir de estos animales, se establecieron dos grupos: control (CN, n=5) y tratado con melatonina (MN, n=5). Los puntos de intervención se realizaron como indica la Figura 1.



**Figura 1. Modelo Experimental.** Esquema temporal del modelo de oveja utilizado en este estudio. A los 3 días de edad, los corderos fueron cateterizados bajo anestesia general. Entre los días 4-12 de edad, se administró el tratamiento (vehículo o melatonina, oral) y se obtuvieron los registros hemodinámicos todas las mañanas. A los 12 días de edad los animales fueron eutanisados para la obtención de muestras.



## **DETERMINACIONES**

### ***BIOMETRÍA CARDÍACA Y CORPORAL***

Al final del período de tratamiento, los animales fueron pesados en una balanza digital y se les determinó la longitud cráneo-caudal (LCC) mediante una cinta métrica. Posteriormente fueron eutanisados con una sobredosis de tiopental sódico ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  e.v. lento, Opet, Laboratorio Chile). Inmediatamente después de la eutanasia y disección, los corazones se cortaron transversalmente en secciones de 1 cm de espesor y se fotografiaron con una cámara digital con una resolución de 10 MP. Luego de esto, se dividieron los diferentes segmentos del corazón en VD, septum, ventrículo izquierdo y aurículas y se registraron sus pesos. Aproximadamente 5 gr de ventrículo derecho fueron congelados en nitrógeno líquido. Finalmente, 2 trozos de  $1 \text{ cm}^2$  del VD se mantuvieron en formaldehído 4% por 24 hrs y luego en PBS a  $4^\circ\text{C}$  para su traslado a Santiago.

El modelo experimental presentado conforma parte del proyecto Fondecyt Regular n° 1110595 de 4 años, por lo que el manejo instrumental que se realizó a los animales estuvo destinado a la obtención de material e información suficientes para dar respuesta a varias otras interrogantes, complementarias con los objetivos planteados en esta tesis.

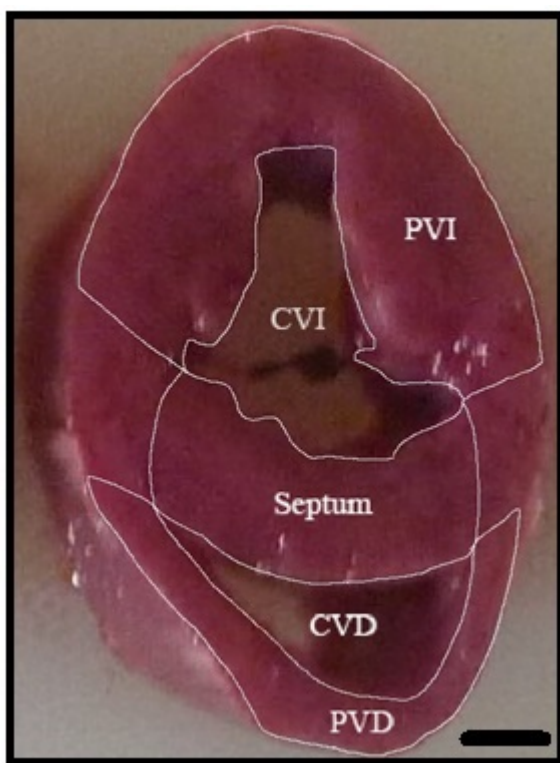
## ***EVALUACIÓN CARDIOVASCULAR IN VIVO***

Las variables de presión arterial sistémica (PAS), frecuencia cardiaca y gasto cardíaco (GC) se registraron en el INCAS durante cada mañana (0900-1100 hrs por 30 minutos) mediante un sistema de adquisición de datos (PowerLab/8SP System y software LabChart v7.0; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) conectado a un computador. El GC se determinó en triplicado mediante el método de termodilución a través de un catéter Swan-Ganz conectado a un computador (modelo COM-2; Baxter, Irvine, CA).

En el registro diario del software (LabChart), para cada día y animal estudiado se seleccionaron tres segmentos de 5 minutos que contuvieran un registro estable de PAS y presión de arteria pulmonar, y mediante el uso del módulo de análisis cardíaco, se obtuvo el cálculo y análisis de SDNN, TOTAL POWER, HF, LF y LF/HF.

## **MORFO-ESTRUCTURA VENTRICULAR DERECHA**

Para el análisis de la morfología macroscópica se utilizaron fotografías de cortes transversales seriados de 1 cm de espesor de ambas cámaras cardíacas, las cuales fueron analizadas por cálculo de área. Mediante un testigo de longitud presente en cada fotografía se determinó la cantidad de píxeles que constituyen un centímetro, para posteriormente trazar los límites que definen la pared libre de cada ventrículo, cámara ventricular y septum interventricular, obteniéndose el cálculo del área automáticamente (Figura 2). Dichos límites se trazaron en tres oportunidades para obtener un promedio representativo. Para la comparación de los resultados, se dividió cada valor de área por el peso corporal y la LCC de cada animal.



**Figura 2. Trazados para cálculo de áreas cardíacas.** Los trazados que circunscriben músculo cardíaco representan pared ventricular y/o septum interventricular. Los trazados restantes definen cavidades ventriculares. Cavidad ventricular izquierda (CVI), pared libre del ventrículo izquierdo (PVI), septum interventricular (Septum), cavidad ventricular derecha (CVD), pared libre del ventrículo derecho (PVD). Barra negra = 1 cm

Para el análisis de la morfología microscópica las muestras de ventrículo se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 3-5  $\mu\text{m}$  de espesor. Se aplicaron tinciones de hematoxilina – eosina para la estimación de la densidad de cardiomiocitos. Los cortes fueron transiluminados y fotografiados mediante un microscopio de luz equipado con una cámara digital (Olympus BX-41, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) para el análisis. La densidad cardiomiocitaria fue determinada mediante la contabilización manual en tres oportunidades del número de núcleos presentes en un área de  $6.25 \text{ cm}^2$ .

### ***EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES EN VENTRÍCULO DERECHO***

Se realizó Western Blot (WB) para determinar el nivel proteico de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. Se realizó homogenización de tejido cardíaco de acuerdo a protocolos previamente publicados (Herrera et al, 2008), los cuales son adecuados para medir proteínas citoplasmáticas. Brevemente, 150 – 250 mg de tejido cardíaco fue lisado en buffer de lisis (63,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 10% glicerol, 2% SDS, 1 mM ortovanadato de sodio, 50 mg/mL leupeptina y 5% 2-mercaptoetanol) y centrifugado a  $5000 \text{ g} \times 10\text{min}$  a  $4^\circ\text{C}$  para obtener un sobrenadante como muestra para realizar WB.

#### *Western blot*

Los lisados de proteína (0,5-30  $\mu\text{g}$  según proteína) fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (4% de gel concentrador y 10% de gel de corrida) con una cámara DCX-700 (Dual Cool Mini-Vertical PAGE/Blotting System California, EE.UU.), realizándose a un voltaje constante de 40 mA por 1 h aproximadamente. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham, Germany) mediante un amperaje constante de 50mA por 2 h. Las membranas fueron

bloqueadas con leche semidescremada al 4% p/v en PBS 1X durante 1 h y posteriormente incubadas durante 1 h con anticuerpos primarios policlonales comerciales para cada una de las proteínas SOD, CAT, GPx y  $\beta$ - actina (Tabla 2). Las membranas fueron lavadas en PBS-Tween e incubadas por 1 h en PBS Tween 0,1%/ leche 0,4%, conteniendo un anticuerpo secundario conjugado con horseradish-peroxidase (HRP). Las proteínas estudiadas fueron detectadas incubando las membranas en un reactivo de quimioluminiscencia (Pierce ECL, Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU) y revelados en placa radiográfica. Las señales obtenidas en las placas fueron escaneadas digitalmente y analizadas por densitometría con el software Scion Image (Scion Image Beta 4.02; Scion Corporation, USA), las cuales fueron expresadas como razón contra  $\beta$ -actina para normalizar el resultado.

**Tabla 2.** *Anticuerpos y condiciones experimentales utilizadas para WB.*

Anticuerpo	Tipo	Hospedero	Peso Molecular	Concentración - cantidad (stock)	Concentración teórica WB	Concentración práctica (carga de proteína) WB
Anti-SOD	Policlonal	Conejo	~ 24 kDa	1 mg/ml - 200 $\mu$ g	0,5 - 2 $\mu$ g/mL (1:500)	1:1000 (10 $\mu$ g)
Anti-catalase	Policlonal	Conejo	~ 65 kDa	10 mg/mL - 1 mL	1:1000 - 1:5000	1:8000 (0,5 $\mu$ g)
Anti GPx	Policlonal	Conejo	~ 22 kDa	0,5 mg/mL - 100 $\mu$ g	1 $\mu$ g/mL (1:500)	1:1000 (30 $\mu$ g)
$\beta$ -actina	Policlonal	Ratón	42 kDa	0,2 mg/mL	(1:5000)	1:5000 (0,5 $\mu$ g)

*Características de los anticuerpos comerciales utilizados para los experimentos de WB. Además, se muestran información relevante de los protocolos determinados.*

## ***ESTRÉS OXIDATIVO EN VENTRÍCULO DERECHO***

La expresión de los marcadores de estrés nitrosativo y oxidativo, nitrotirosina (NT) y 4-Hidroxinonenal (4-HNE) se determinaron a través de WB.

La extracción de proteína se realizó a partir de la muestra congelada de tejido cardíaco, mediante homogenización mecánica en buffer RIPA (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton x-100 0,8%, Desoxicolato 0,8%, Leupeptina 0,002 mM, Pepstatina 0,001 mM, Fluoruro de Sodio 1 mM, PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM), donde por cada 200 mg de tejido se agregó 1 mL del buffer. Posterior a la lisis mecánica, el homogenizado se centrifugó por 10 minutos a 11.600 g a 0°C, después de lo cual el sobrenadante fue conservado a -80°C. La concentración de proteínas en el homogenizado fue cuantificada por el método de Bradford a una longitud de onda de 595nm.

Los lisados de proteína (1-40 µg según proteína) fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (4% de gel concentrador y 10% de gel de corrida al 10%) (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis (BioRad Mini-Vertical PAGE/Blotting System California, EE.UU.), a un amperaje constante de 50 mA por 2 horas aproximadamente. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas separadas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham, Germany) a un voltaje constante de 50 V por 2 h.

Luego, las membranas fueron bloqueadas con leche semidescremada al 4% p/v en PBS 1X por 1 h y posteriormente fueron incubadas durante 1 h con anticuerpos primarios comerciales para cada una de las proteínas (Tabla 1), posterior a lo cual se lavaron 3 veces por 10 min en PBS 1X y Tween 20 al 25%. Luego, estas membranas fueron incubadas por 1 h en PBS 1X, Tween

20 0,1%/ leche 0,4% conteniendo un anticuerpo secundario conjugado con HRP (Anti Mouse, Millipore, MAB3572; Anti Rabbit). Nuevamente, se realizaron 3 lavados por 10 minutos cada uno, para luego incubar por 5 minutos con una mezcla de 4 mL de Super Signal West Pico (2mL de SuperSignal West Pico Stable Peroxide + 2 mL Super Signal West Pico Luminol/Enhancer). Posteriormente, la membrana fue montada en una cámara reveladora Li-Cor C-Digit Modelo 3600, y se cuantificó la expresión proteica por densitometría clásica utilizando el software Image Studio V.3.1. Las densidades de las señales se expresaron como razón de NT/ $\beta$ -actina y razón 4-HNE/  $\beta$ -actina para normalizar por carga.

**Tabla 1.** Características de los anticuerpos utilizados para marcadores de estrés oxidativo en WB

Anticuerpo	Tipo/Hospedero	Peso Molecular de proteína	Concentración de incubación
Anti-NT	Monoclonal/ratón	85 kDa	1:1000
Anti-4-HNE	Policlonal/conejo	Multibanda	1:1000
Anti- $\beta$ -actina	Monoclonal/ratón	42 kDa	1:5000

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

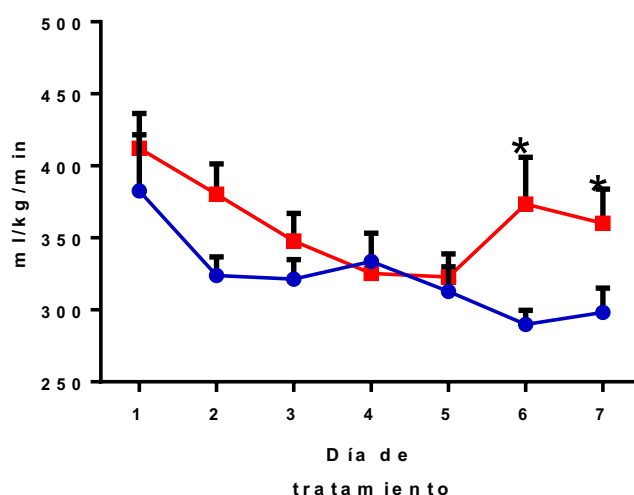
Para comparar los resultados de marcadores de EO y capacidad antioxidante se utilizó prueba de t-student no pareada. Para comparar los resultados de función cardíaca se utilizó ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey para la comparación de promedios entre cada uno de los días de tratamiento y los grupos experimentales. Así mismo, se aplicó una prueba de t-student no pareada para cada día entre ambos grupos. Todos los resultados se expresan como promedios  $\pm$  error estándar de la media (ESM), y tanto éstos como las pruebas estadísticas fueron realizadas usando el software GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$ .



## RESULTADOS

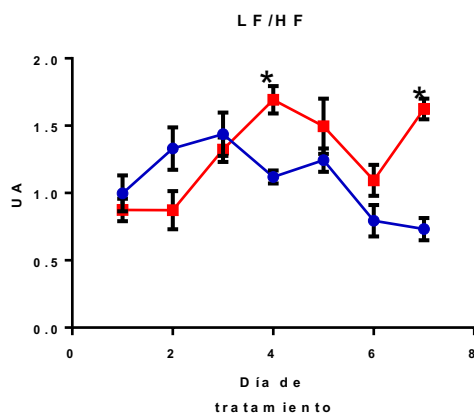
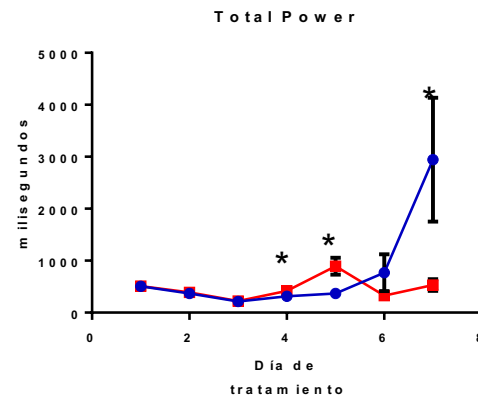
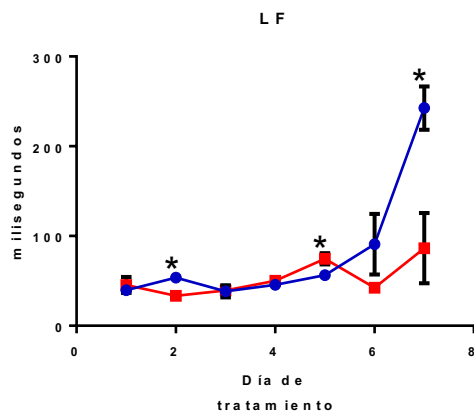
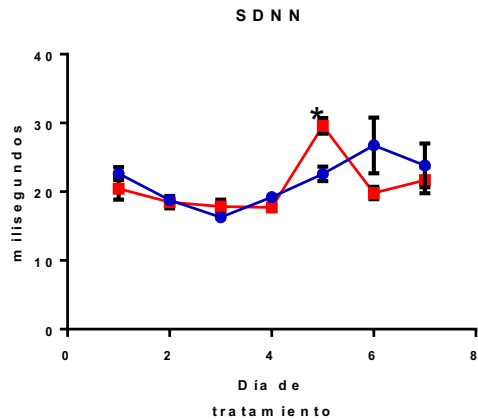
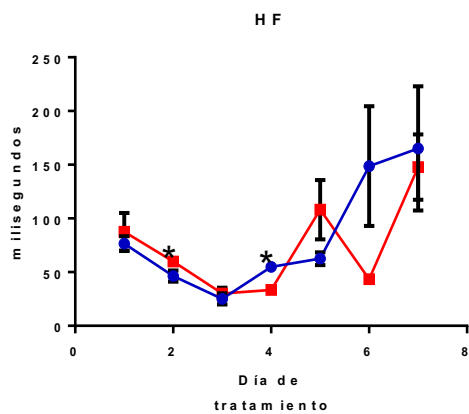
### VARIABLES CARDÍACAS FUNCIONALES

En los primeros 5 días de tratamiento se observó una caída progresiva del GC, sin diferencias entre grupos. Sin embargo, el grupo MN presentó un aumento del gasto cardíaco hacia el final del tratamiento en comparación con el grupo CN a partir del sexto día de tratamiento ( $p < 0,05$ ) (Figura 3).



**Figura 3. Gasto Cardíaco.** Gasto cardíaco por día durante el tratamiento en grupo control (CN, círculos azules,  $n=5$ ) y grupo tratado con melatonina (MN, cuadrados rojos,  $n=5$ ). Los resultados están expresados en promedios  $\pm$  SEM. Significancia estadística ( $p \leq 0,05$ ): \* vs CN.

Respecto de la VC en ambos dominios, se observaron diferencias significativas transitorias y fluctuantes entre ambos grupos, sin establecerse un patrón permanente de cambio en ninguna de las variables. Sin embargo, destaca que en el grupo MN hubo un aumento y descenso precoz de HF y LF al segundo día (Figura 4).



**Figura 4. Variabilidad Cardíaca.** Altas frecuencias (HF), bajas frecuencias (LF), relación LF/HF (LF/HF), desviación estándar de los intervalos entre latidos (SDNN) y poder total de variabilidad (TOTAL POWER) durante los días de tratamiento en grupo control (CN, barra azul, n=5) y grupo tratado con melatonina (MN, barras rojas, n=5). Los resultados están expresados en promedios  $\pm$  SEM. Significancia estadística ( $p \leq 0,05$ ): \* vs CN.

## BIOMETRÍA CORPORAL Y CARDÍACA

La Tabla 3 muestra los parámetros de biometría corporal y cardíaca entre las ovejas de ambos grupos. No se observaron diferencias en peso y talla corporal, así como en el peso de las estructuras cardíacas en el grupo MN.

**Tabla 3.** *Parámetros biométricos corporales y cardíacos.*

	CN (n=5)	MN (n=5)	Diferencia Estadística
<i>Peso Corporal (g)</i>	7240 ± 749.4	7320 ± 751.9	NS
<i>LCC (cms)</i>	58.5 ± 2.1	57.2 ± 1.1	NS
<i>Peso Cardíaco (g)</i>	58.7 ± 2.6	62.5 ± 4.2	NS
<i>Peso VD (g)</i>	10.1 ± 0.8	9.2 ± 1.0	NS
<i>Peso VI (g)</i>	21.3 ± 1.7	17.9 ± 1.2	NS
<i>Peso Septum (g)</i>	10.4 ± 0.9	11.1 ± 0.8	NS

*Longitud Cráneo Caudal (LCC), ventrículo derecho (VD), ventrículo izquierdo (VI). Grupo control (CN) y tratado con melatonina (MN). Los resultados se expresan en promedio ± SEM. NS, no significativo.*

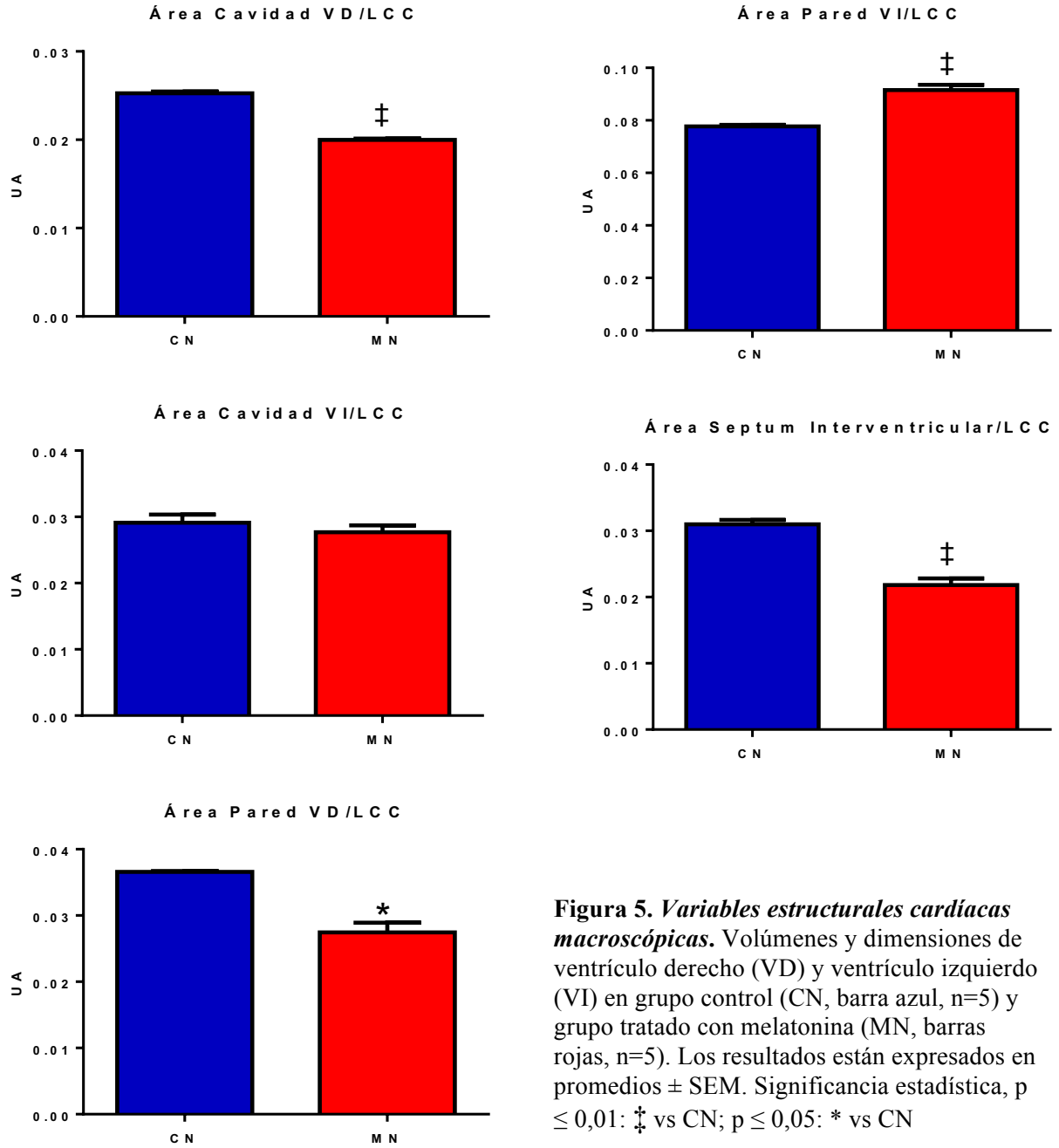
## VARIABLES CARDÍACAS ESTRUCTURALES

Los resultados de las variables estructurales macroscópicas se presentan en la Tabla 4 y en la Figura 5. El grupo MN presenta una menor relación del área de la cavidad ventricular del VD/LCC, así como una menor relación del área de la pared del VD/LCC respecto del grupo CN. Adicionalmente, se observó en el grupo MN una menor relación del área del septum interventricular/LCC respecto del grupo CN. Así mismo, el grupo MN mostró una mayor relación del área de la pared del VI/LCC respecto del grupo CN. No se observaron diferencias en la relación área de la cavidad del VI/LCC.

**Tabla 4.** *Variables estructurales macroscópicas*

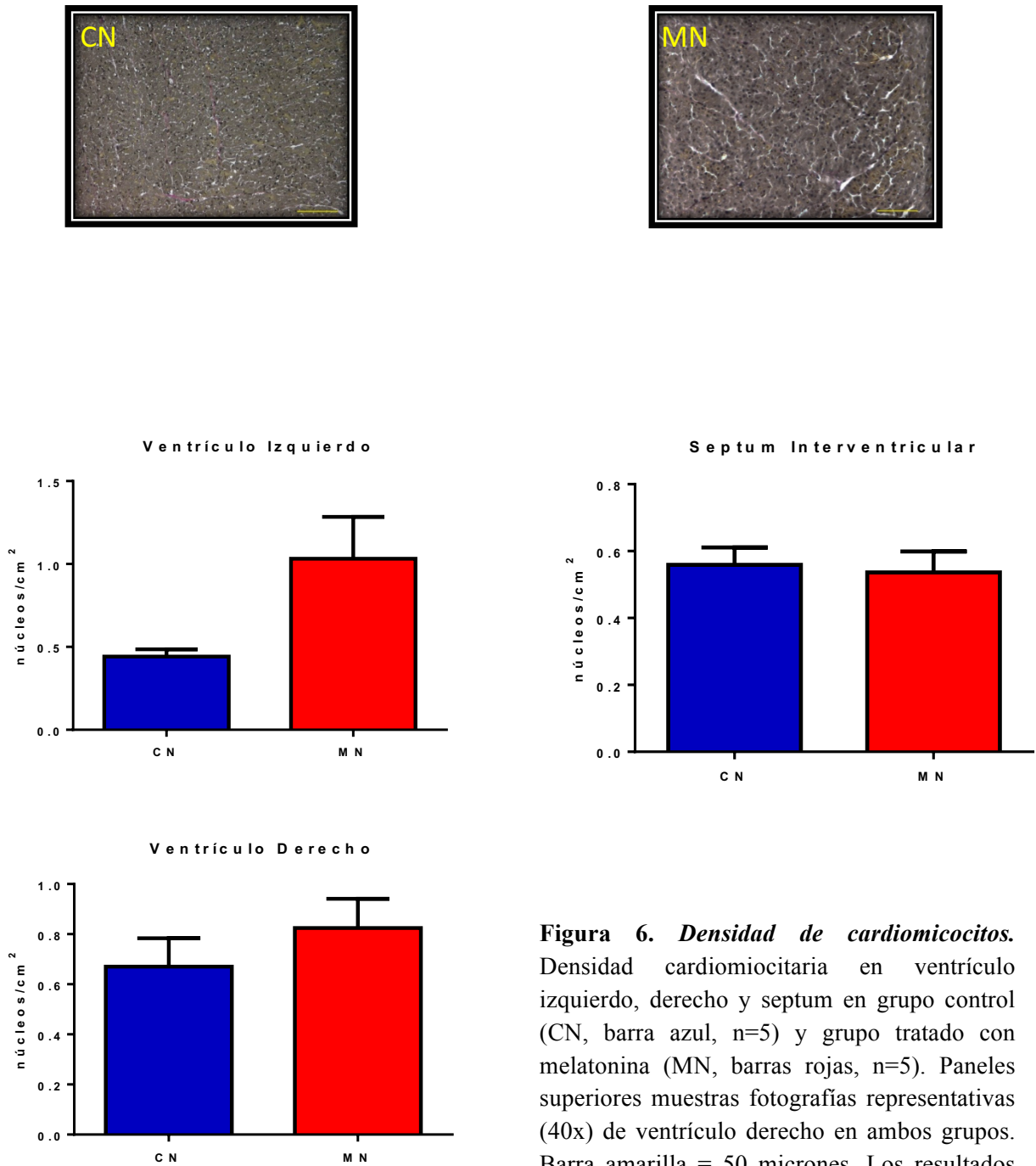
	CN	MN	Diferencia Estadística
<i>Área Cavidad VD / LCC (UA)</i>	0,0254 ± 0,0002	0,0211 ± 0,0001	$p \leq 0,01$
<i>Área Cavidad VI / LCC (UA)</i>	0,0292 ± 0,0012	0,0272 ± 0,0010	NS
<i>Área Pared VD / LCC (UA)</i>	0,0363 ± 0,0001	0,0276 ± 0,0014	$p \leq 0,05$
<i>Área Pared VI / LCC (UA)</i>	0,0772 ± 0,0005	0,0912 ± 0,0019	$p \leq 0,01$
<i>Área Septum Interventricular / LCC (UA)</i>	0,0315 ± 0,0006	0,0212 ± 0,0010	$p \leq 0,01$

*Ventrículo derecho (VD), ventrículo izquierdo (VI), unidades arbitrarias (UA). Grupo control (CN) y tratado con melatonina (MN). Los resultados se expresan en promedio ± SEM. NS, no significativo.*



**Figura 5. Variables estructurales cardíacas macroscópicas.** Volúmenes y dimensiones de ventrículo derecho (VD) y ventrículo izquierdo (VI) en grupo control (CN, barra azul, n=5) y grupo tratado con melatonina (MN, barras rojas, n=5). Los resultados están expresados en promedios  $\pm$  SEM. Significancia estadística,  $p \leq 0,01$ : ‡ vs CN;  $p \leq 0,05$ : \* vs CN

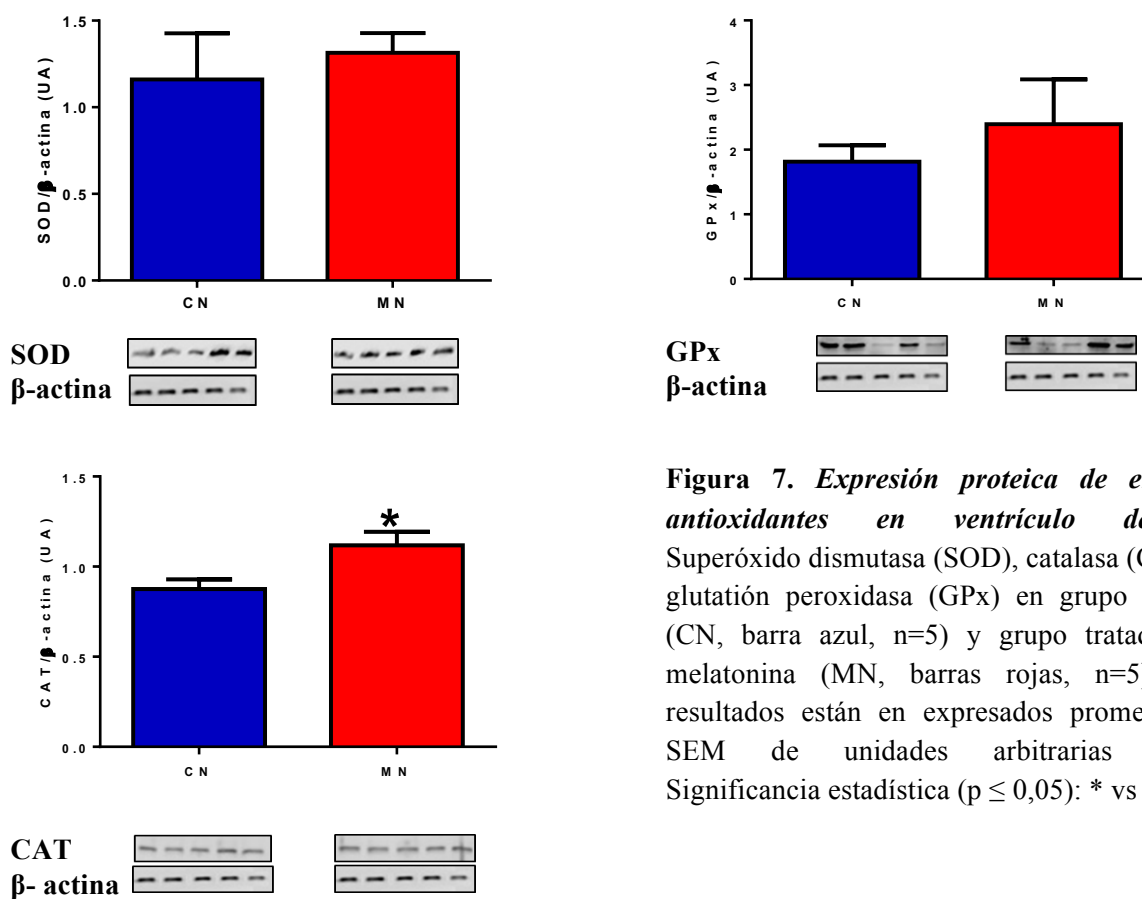
Respecto de la densidad cardiomiocitaria, no se observaron diferencias entre grupos en VI, VD o septum interventricular (Figura 6).



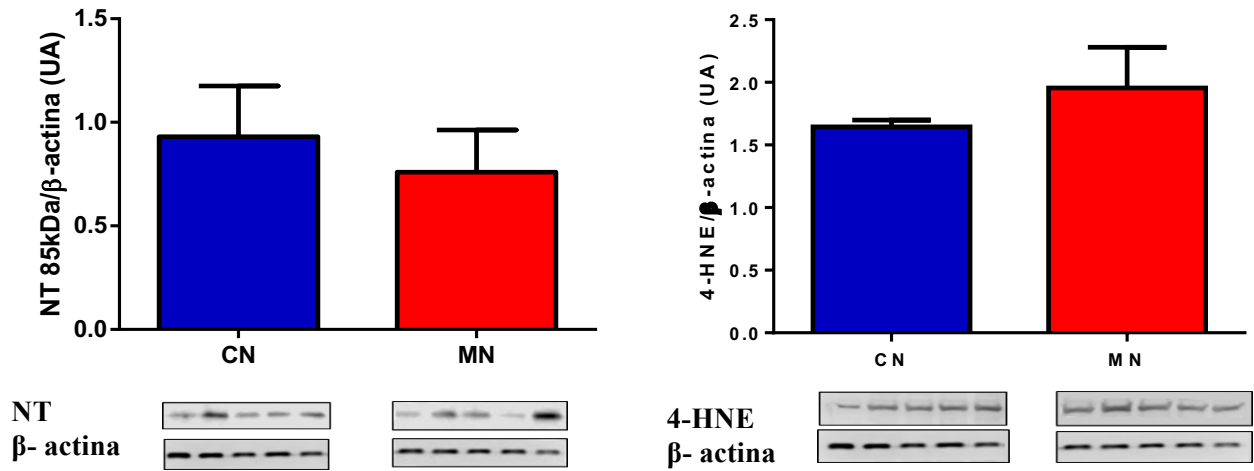
**Figura 6. Densidad de cardiomicocitos.** Densidad cardiomiocitaria en ventrículo izquierdo, derecho y septum en grupo control (CN, barra azul, n=5) y grupo tratado con melatonina (MN, barras rojas, n=5). Paneles superiores muestras fotografías representativas (40x) de ventrículo derecho en ambos grupos. Barra amarilla = 50 micrones. Los resultados están expresados en promedios  $\pm$  SEM. Significancia estadística ( $p \leq 0,05$ ): \* vs CN.

## EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES Y MARCADORES DE ROS/RNS

Respecto de proteínas antioxidantes, en el grupo MN se observó una mayor expresión de CAT en comparación con el grupo CN (CN  $0,876 \pm 0,053$  vs MN  $1,118 \pm 0,074$ ;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 7). En contraste, no se evidenciaron diferencias en la expresión de SOD y GPx entre ambos grupos. De igual forma, la expresión de marcadores de estrés oxidativo, NT y 4HNE, fueron similares entre grupos (Figura 8).



**Figura 7.** *Expresión proteica de enzimas antioxidantes en ventrículo derecho.* Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en grupo control (CN, barra azul, n=5) y grupo tratado con melatonina (MN, barras rojas, n=5). Los resultados están en expresados promedios  $\pm$  SEM de unidades arbitrarias (UA). Significancia estadística ( $p \leq 0,05$ ): \* vs CN.



**Figura 8. Expresión de marcadores de estrés oxidativo en ventrículo derecho.** Nitrotirosina (NT), 4-hidroxinonenal (4-HNE), en grupo control (CN, barra azul, n=5) y grupo tratado con melatonina (MN, barras rojas, n=5). Los resultados están expresados en promedios  $\pm$  SEM.



## DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que evalúa la función y estructura cardíaca asociada al balance redox en neonatos con hipertensión pulmonar en altura, luego de un tratamiento postnatal con melatonina. Pudimos constatar que el grupo de ovejas tratado con melatonina muestra mejoría en el perfil de funcionalidad cardíaca, medido a través del GC, sin cambios constantes en la VC, así como una mejoría en los índices de remodelamiento cardíaco, principalmente a nivel del VD y septum interventricular. Por otro lado, si bien hay mayor expresión de una enzima antioxidante, no evidenciamos diferencias en los marcadores de estrés oxidativo entre los grupos.

Durante la vida fetal, la saturación y el contenido arterial de oxígeno son menores en comparación con otras etapas de la vida. Esto determina que exista una mayor resistencia vascular pulmonar, lo cual aumenta la postcarga del VD, sobretudo en el periodo postnatal inmediato cuando se cierra el ductus arterioso. Este aumento de postcarga determina cambios sobre la organización muscular cardíaca. Estudios en fetos de cerdo (Hislop et al, 1972) y en neonatos humanos gestados y nacidos a nivel del mar (Peñaloza et al, 1964) han mostrado que tanto el peso como el tamaño de ambos ventrículos es similar al momento del nacimiento. Sin embargo, posterior a éste y fundamentalmente producto de la inversión de resistencias vasculares en ambos circuitos, el VI experimenta una hipertrofia e hiperplasia cardiomiocitaria (Beinlich et al, 1995), asociada a un aumento del contenido de colágeno extracelular del mismo (Carver et al, 1993). Este fenómeno explicaría que la relación entre el peso del VI/VD aumenta a medida que se progresa en la vida postnatal. Por lo anterior, cualquier fenómeno que altere el proceso en las resistencias vasculares postnatales impactará sobre esta transición fisiológica de la estructura ventricular. Sin embargo, en tierras altas la hipoxemia persiste durante el período

neonatal e induce un aumento en el tono vascular pulmonar, incrementa la resistencia vascular y por lo tanto genera un aumento sostenido de la postcarga sobre el VD. Esto genera un estrés de la pared ventricular, lo cual constituye el principal estímulo hipertrófico del mismo (Grossman et al, 1975). Así, se ha observado un aumento del tejido cardíaco a nivel de la base ventricular (Recavarren et al, 1962) y del septum interventricular, sumado a un aumento global del volumen cardíaco (Villamor et al, 2004; Agger et al, 2016). Estos cambios se asocian a una disminución en la contractilidad ventricular y caída del GC, lo cual ensombrece el pronóstico del neonato (Kinsella et al, 1995; Jain et al, 2015). Aunque los mecanismos involucrados no están del todo dilucidados, se ha demostrado que el estrés oxidativo tiene un rol importante pues un tratamiento antioxidante es capaz de revertir los efectos de la hipoxia crónica durante el desarrollo. En estudios de ratas y pollos gestados (o incubados) en hipoxia se ha observado, por ejemplo, un aumento en distintos marcadores de estrés oxidativo en el tejido cardíaco, como la relación de glutatión oxidado/reducido y niveles de malondialdehído (Rueda-Clausen et al, 2012), HSP70 (Giussani et al., 2012), 3-nitrotirosina y 4-hidroxinonenal (Itani et al, 2016). Consecuentemente, la administración prenatal de ácido ascórbico (Giussani et al., 2012) como de melatonina (Itani et al, 2016) se asocian a una disminución en los niveles de dichos marcadores y una mejor contractilidad miocárdica.

En este estudio se observa que la administración de melatonina produce una reversión de los cambios estructurales miocárdicos en la HTPRN, evidenciados por una menor área de la pared del VD y del septum interventricular. Si bien constituyen nuevos y promisorios hallazgos dentro del manejo de la patología en este modelo de estudio y tratamiento, una limitante en estos resultados surge al no incorporar un grupo control de tierras bajas. Adicionalmente, el grupo tratado con melatonina presenta una mayor densidad celular en el VI pero que no logra ser

estadísticamente significativa ( $p=0.08$ ), probablemente relacionada con el menor número de neonatos de oveja incorporados en este estudio, en comparación a los estudios previos con este modelo (Torres et al, 2015). Estudios previos han identificado a la melatonina como una hormona cardioprotectora, efecto que se explica por 3 mecanismos: 1) favorecer el balance redox, lo que disminuye el estímulo hipertrófico por aumento de ROS/RNS (Reiter et al, 2003); 2) aumento de la producción y biodisponibilidad de NO, el cual tiene un efecto antiproliferativo (Paulis et al, 2010); y 3) disminución de cifras de presión arterial sistémica y pulmonar, lo que interrumpe el estímulo hipertrófico hemodinámico (Simko et al, 2007). Posiblemente, nuestros resultados estén relacionados con estos últimos dos mecanismos. Torres et al, observaron que melatonina se asocia a una mayor biodisponibilidad de NO en tejido pulmonar, principalmente por medio de su efecto *scavenger* sobre el  $\cdot O_2^-$ . Así mismo, se asocia a una disminución de PAP, mediante una mayor vasodilatación mediada por NO en arteriolas pulmonares de resistencia. Estos efectos serían independientes y dependientes del receptor MT2, respectivamente.

Desde un punto de vista funcional, la hipertrofia ventricular es un arma de doble filo, ya que por un lado, permite mantener el GC pero a expensas de una disminución de la reserva funcional en la contractilidad miocárdica. En un estudio que evaluó la respuesta cardiovascular de recién nacidos de oveja en hipoxia versus normoxia, se evidenció que existe un aumento significativo en el GC de reposo en el grupo gestado y nacido en altura (3600 m) versus aquellos nacidos y gestados a nivel del mar (Herrera et al, 2007). Sin embargo, al someter estos animales a un episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta, el grupo de ovejas de altura no presentó un aumento del GC respecto de la situación de reposo e incluso fue significativamente menor que el grupo control (Herrera et al, 2007). Por otro lado, reportes sobre la función cardíaca en un modelo de hipertensión pulmonar por monocrotalina en ratas muestra que a medida que aumenta la

hipertrofia del VD se evidencia un aumento progresivo del volumen de fin de diástole ventricular, disminución de la fracción de eyección y caída del GC en el grupo tratado versus el control (Hessel et al, 2006). Estos elementos constituyen el “punto de no retorno” en términos de gravedad de la patología y del pronóstico clínico, y marcan las diferencias entre una hipertrofia compensatoria o adaptativa y una crónica maladaptativa (Ryan et al, 2014).

Los fenómenos asociados al proceso maladaptativo están relacionados con cambios ultraestructurales y metabólicos en los cardiomiocitos. Se ha descrito una alteración del citoesqueleto cardiomiocitario del VD caracterizada por una pérdida parcial y desorganización de estriaciones, costámeros y discos intercalados (Lemler et al, 2000), disminución de conexinas (Montgomery et al, 1998), así como expresión de cadenas pesadas de miosina tipo  $\beta$  (Adrogué et al, 2005). Junto a esto último se ha descrito un cambio en el metabolismo cardiomiocitario. Desde el punto de vista metabólico, se ha descrito un aumento en la expresión de enzimas relacionadas con la glicólisis por sobre aquellas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos, y una disminución de la expresión de  $\text{Ca}^{+2}$  – ATPasa de retículo endoplásmico (SERCA 2a) (Adrogué et al, 2005). En conjunto, estas alteraciones determinan una disminución en la actividad contráctil del VD.

En este estudio se observó un aumento del gasto cardíaco hacia el final del período de tratamiento con melatonina. Una posible explicación a estos resultados es el rol de melatonina en la función mantención de la integridad del citoesqueleto celular. Esto se ha observado en neuronas, donde melatonina es capaz de abolir los efectos disruptivos sobre la polimerización de tubulina del complejo  $\text{Ca}^{+2}$ -Calmodulina, mediante unión antagónica a esta última. Existen reportes de la interacción de melatonina y el complejo  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina sobre la polimerización tubular y cambios en el citoesqueleto en cultivos celulares de neuronas, ejerciendo, además, un

efecto protector sobre dicho tejido (Benítez-King, 2006). Interesantemente, este efecto no es mediado por receptores de membrana, dependiendo del efecto *scavenger* sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de la activación de protein-quinasa C (Benítez-King et al, 2005). Si bien estos mecanismos no fueron evaluados en este trabajo, constituyen probables fenómenos en neonatos y debieran ser evaluados en una nueva línea de investigación sobre los efectos de melatonina. Lo que sí está claro es que los animales tratados con melatonina tienen menor área muscular cardíaca (en VD y septum interventricular) y un mayor GC, denotando una optimización del trabajo cardíaco.

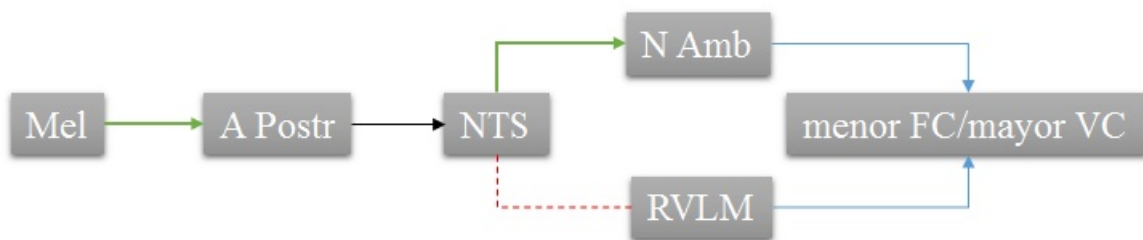
La HTPRN está íntimamente relacionada con hipoxia y el consecuente desarrollo de estrés oxidativo y nitrosativo a nivel de la vasculatura pulmonar (Torres et al, 2015). Pusimos a prueba la hipótesis de que el remodelamiento cardíaco maladaptativo en la HTPRN se asocia a un aumento en la producción y efecto oxidativo de ROS/RNS –cuantificados a través de la determinación de NT y 4HNE. A pesar de que se describe a melatonina como un potente antioxidante (Galano et al, 2011), no encontramos diferencias entre ambos grupos respecto de los niveles de dichos marcadores. Un reciente trabajo mostró un aumento en los marcadores de ROS/RNS en embriones de pollo gestados en hipoxia hipobárica versus aquellos gestados en normoxia, y que dichos niveles se hacían significativamente menores con la administración de melatonina en una dosis equivalente a la de este estudio. Sin embargo, melatonina se administró por vía parenteral y de forma antenatal (al huevo), sumado al hecho de que las diferencias observadas fueron evidenciadas en homogenizados de corazón completo (Itani et al, 2016). Se ha descrito también, en un modelo de hipoxia hipobárica intermitente, una disminución en marcadores de peroxidación lipídica en tejido cardíaco completo con la administración de melatonina. Sin embargo, la dosis y la duración del tratamiento con melatonina fue muy superior a la utilizada en este estudio (Farías et al, 2012). Una explicación a la diferencia con nuestros

resultados estaría relacionada con la farmacocinética de la administración exógena de melatonina. Primero, después de su administración por vía oral, el tiempo que demora en alcanzar su concentración plasmática máxima ( $T_{max}$ ) fluctúa entre 15 a 210 minutos, siendo dependiente de la formulación administrada (liberación inmediata versus prolongada), y directamente relacionado con la dosis administrada (2 a 25 mg). Así mismo, el tiempo necesario para disminuir a la mitad la concentración plasmática de melatonina (vida media de eliminación) fluctúa entre 32 a 126 minutos, siendo también dependiente de la dosis administrada (Harpsoe et al, 2015); estas características se deben a que tanto la absorción como la eliminación siguen una cinética de primer orden. Segundo, la biodisponibilidad de melatonina es baja cuando se administra por vía oral e incluso su concentración plasmática máxima es muy variable entre sujetos con una misma dosis por esta vía (Andersen et al, 2016). Tercero, si se busca que melatonina ejerza su acción como *scavenger*, se recomienda que la administración esté coordinada con la aparición del insulto generador de ROS/RNS (Reiter et al, 2014). Tomados en conjunto, estos datos permiten plantear que, para lograr un efecto antioxidante acorde a estos parámetros, los horarios, la formulación del preparado y la vía de administración deberían ajustarse al mejor modelo farmacocinético disponible. Paralelamente, creemos que sería necesario contrastar los resultados con un grupo control de tierras bajas, de tal manera de poder pesquisar los efectos de la altura y su variación con el tratamiento con melatonina.

La VC permite evaluar el desbalance autonómico. Una interesante observación es el hecho de que tanto el feto como el neonato presentan la mayor FC en la vida del ser humano. Esto se debe a que la maduración del SNA no ha finalizado, existiendo inicialmente un predominio del tono simpático por sobre el parasimpático. Sin embargo, en respuesta a hipoxemia durante la vida fetal, se activa el quimioflejo carotideo, que a través del nervio vago induce una marcada

bradicardia que disminuye el gasto cardíaco y disminuye el consumo cardíaco (Giussani, 2016). Desde el punto de vista funcional, este hecho es importante a la luz del consumo de oxígeno cardíaco; por un lado, la menor frecuencia cardíaca traduce una caída del trabajo ventricular, y por otro, alarga la duración de la diástole ventricular y con ello mejora el flujo coronario. En la vida postnatal esto se revierte y comienza un predominio simpático, tanto en la función basal como en respuesta a desafíos cardiovasculares como la hipoxemia y/o cambios en la presión (Giussani, 2016). Así, un mayor tono simpático explica que exista una menor VC determinada por predominancia de LF. En un estudio de ratas adultas gestadas en hipoxia, se ha observado un aumento de la relación LF/HF, probablemente relacionado con un fenómeno de programación autonómica mediada por ROS/RNS, la cual se revierte con la administración de ácido ascórbico (Kane et al, 2013). Interesantemente, parece ser que la vitamina C ejerce estos efectos moduladores autonómicos mediante el control de ROS/RNS en baroreceptores carotídeos y en el núcleo del tracto solitario (NTS). Por otro lado, la administración de melatonina se asocia a una rápida pero transitoria mejoría de los parámetros de VC en sujetos adultos sanos (Nishiyama et al, 2001). Con estos antecedentes, pusimos a prueba la hipótesis de que la administración de melatonina, dadas sus propiedades antioxidantes, es capaz de mejorar el perfil de activación autonómica en el corazón mediada por ROS/RNS en la HTPRN. Llama la atención la presencia de cambios fluctuantes en los índices de VC, sin evidenciar un patrón consistente de respuesta. Pensamos que la consideración tanto de los protocolos de administración, como de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ambas sustancias resultan elementos importantes a analizar al momento de comparar resultados. En el trabajo de Kane et al, la dosis de vitamina C utilizada excede las dosis utilizadas en humanos. Así mismo, se caracteriza por ejercer un efecto a nivel de baroreceptores y del NTS, favoreciendo el restablecimiento de los baroreflexos cardíacos, con el consecuente balance

autonómico. Similares hallazgos han sido descritos para melatonina, donde en individuos sanos y mediante un protocolo de administración por vía parenteral, se observó una disminución de la FC y presión arterial sistémica media respecto del grupo control (Campos et al, 2013). Además, estos efectos se pierden al generar una ablación quirúrgica del área postrema, estructura que está íntimamente relacionada con el sistema de baroreflejos cardíacos, el cual posee una alta densidad de receptores de melatonina tipo 1 y 2. Por lo tanto, futuros estudios en HTPRN que incluyan cambios en estos parámetros podrían dar mayor claridad respecto del efecto de su administración. En la figura 9 se muestra el potencial efecto de melatonina sobre el control de la FC y VC a nivel del SNC



**Figura 9. Potencial efecto de melatonina sobre el control central de FC y VC.** Melatonina (Mel), mediante la estimulación de la actividad del área postrema (A Postr), determinaría un cambio en la actividad del núcleo del tracto solitario (NTS), estimulando e inhibiendo las descargas preganglionares del núcleo *ambiguus* (NAmb, división parasimpática) y de la médula ventrolateral rostral (RVLM, división simpática), respectivamente. Las flechas verdes continuas y las rojas discontinuas indican estimulación e inhibición de las descargas neuronales, respectivamente. Frecuencia cardíaca (FC) y variabilidad cardíaca (VC). Adaptado de Dampney (1994). *Physiol Rev.* 74(2): 323-64



## **CONCLUSIÓN**

La administración postnatal de melatonina podría favorecer la reversión de los cambios estructurales macroscópicos y funcionales del VD propios de la HTPRN. Estos cambios no se relacionaron con una disminución en los marcadores de ROS/RNS. Futuros estudios que comparen los cambios con la administración de melatonina entre animales de tierras bajas y altura, así como con diferentes protocolos de administración de melatonina deberían dilucidar los efectos sobre dichos marcadores y sobre la variabilidad cardíaca.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abman SH. Abnormal vasoreactivity in the pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn (1999). *Pediatr Rev.* 20(11): e103-9.
- Adrogué JV, Sharma S, Ngumbela K, Essop MF, Taegtmeyer H (2005). Acclimatization to chronic hypobaric hypoxia is associated with a differential transcriptional profile between the right and left ventricle. *Mol Cell Biochem.* 278(1-2): 71-8.
- Agger P, Lakshminrusimha S, Laustsen C, Gugino S, Frandsen JR, Smerup M, Anderson RH, Hjortdal V, Steinhorn RH (2016). The myocardial architecture changes in persistent pulmonary hypertension of the newborn in an ovine animal model. *Pediatr Res.* 79(4): 565-74.
- Andersen LP, Gögenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. Pharmacokinetics of Melatonin: The Missing Link in Clinical Efficacy? (2016). *Clin Pharmacokinet.* 55(9): 1027-30.
- Bärtsch P, Gibbs JS (2007). Effect of altitude on the heart and lungs. *Circulation.* 116(19): 2191-202.
- Bartos DC, Grandi E, Ripplinger CM (2015). Ion Channels in the Heart. *Compr Physiol.* 5(3): 1423-64.
- Beinlich CJ, Rissinger CJ, Morgan HE (1995). Mechanisms of rapid growth in the neonatal pig heart. *J Mol Cell Cardiol.* 27: 273–281.
- Benítez-King G, Ortiz-López L, Jiménez-Rubio G (2005). Melatonin precludes cytoskeletal collapse caused by hydrogen peroxide: Participation of protein kinase C. *Therapy.* 2: 767–778
- Benítez-King G (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 40(1): 1-9.
- Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta.* 620(2): 281-296.
- Berntson GG, Bigger T, Eckberg DL, Grossman P, Kaufmann PG, Malik M, Nagaraja HN, Porges SW, Saul JP, Stone PH, van der Molen M (1997). Heart rate variability: origins, methods and interpretive caveats. *Psychophysiology.* 34: 623-48.

- Bienias P, Ciurzynski M, Kostrubiec M, Rymarczyk Z, Kurzyna M, Korczak D, Roik M, Torbicki A, Fijalkowska A, Pruszczyk P (2015). Functional class and type of pulmonary hypertension determinate severity of cardiac autonomic dysfunction assessed by heart rate variability and turbulence. *Acta Cardiol.* 70(3): 286-96.
- Billman GE, Schwartz PJ, Stone HL (1982). Baroreceptor reflex control of heart rate: a predictor of sudden cardiac death. *Circulation.* 66: 874–80.
- Brennan LA, Steinhorn RH, Wedgwood S, Mata-Greenwood E, Roark EA, Russell JA, Black SM (2003). Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase. *Circ Res.* 92: 683–691
- Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases (2013). *Biochim Biophys Acta.* 1830(5): 3289-3303.
- Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM (2012). Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res.* 111(8):1091-106.
- Burtcher M, Bachmann O, Hatzl T, Hotter B, Likar R, Philadelphia M, Nachbauer W (2001). Cardiopulmonary and metabolic responses in healthy elderly during a one week hiking program at high-altitude. *Eur J Appl Physiol.* 84:379–386.
- Burtcher M (2010). Effects of acute altitude exposure: which altitude can be tolerated?. *Wien Med Wochenschr.* 160(13-14):362-71.
- Cabral J, Belik J (2013). Persistent pulmonary hypertension of the newborn: recent advances in pathophysiology and treatment. *J Pediatr (Rio J).* 89(3): 226-242.
- Campos LA, Cipolla-Neto J, Michelini LC (2013). Melatonin modulates baroreflex control via area postrema. *Brain Behav.* 3(2): 171-7.
- Carver W, Terracio L, Borg TK (1993). Expression and accumulation of interstitial collagen in the neonatal rat heart. *Anat Rec.* 236: 511–520.
- Castillo-Galán S, Quezada S, Moraga FA, Ebensperger G, Herrera EA, Beñaldo F, Hernandez I, Ebensperger R, Ramirez S, Llanos AJ, Reyes RV (2016). 2-aminoethyldiphenylborinate modifies the pulmonary circulation in pulmonary hypertensive newborn lambs with partial gestation at high altitude. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 311(4): L788-L799.
- Caviedes I, Uriarte P (2009). Fisiopatología del Ventrículo Derecho. *Rev Chil Enf Resp.* 25: 170-181.

- Chen T, Jin X, Crawford BH, Cheng H, Saafir TB, Wagner MB, Yuan Z, Ding G (2012). Cardioprotection from oxidative stress in the newborn heart by activation of PPARgamma is mediated by catalase. *Free Radic Biol Med.* 53(2): 208-215.
- Crosswhite P, Sun Z (2010). Nitric Oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. *J Hypertens.* 28: 201-212.
- Dampney RA (1994). Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 74(2): 323-64.
- Davies P, Burke G, Reid L (1986). The structure of the wall of the rat intraacinar pulmonary artery: an electron microscopic study of microdissected preparations. *Microvasc Res.* 32: 50–63.
- Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A (2016). A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *Eurasian J Med.* 48(2): 135-41.
- Eriksen V, Nielsen LH, Klokke M, Greisen G (2009). Follow-up of 5- to 11-year-old children treated for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Acta Paediatr.* 98(2): 304.
- Fariás JG, Zepeda AB, Calaf GM (2012). Melatonin Protects the Heart, Lungs and Kidneys from Oxidative Stress under Intermittent Hypobaric Hypoxia in Rats. *Biological Research.* 45(1): 81-85.
- Fauchier L, Babuty D, Melin A, Bonnet P, Cosnay P, Fauchier PJ (2004). Heart rate variability in severe right or left heart failure: the role of pulmonary hypertension and resistances. *Eur J Heart Fail.* 6(2):181-5.
- Frank L, Groseclose EE (1984). Preparation for birth into an O<sub>2</sub>-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. *Pediatr Res.* 18(3): 240-244.
- Galano A, Tan DX, Reiter RJ (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res.* 51(1): 1-16.
- Giussani DA, Camm EJ, Niu Y, Richter HG, Blanco CE, Gottschalk R, Blake EZ, Horder KA, Thakor AS, Hansell JA, Kane AD, Wooding FB, Cross CM, Herrera EA (2012). Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS One.* 7(2): e31017.
- Giussani DA (2016). The fetal brain sparing response to hypoxia: physiological mechanisms. *J Physiol.* 594(5):1215-30

- Goyal MM, Basak A (2010). Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*. 1(10): 888-897.
- Green D, Reed JC (1998). Mitochondria and Apoptosis. *Science*. 281(5381): 1309-1312.
- Griffin MP, Moorman JR (2001). Toward the early diagnosis of neonatal sepsis and sepsis-like illness using novel heart rate analysis. *Pediatrics*. 107(1): 97-104.
- Griffin MP, O'Shea TM, Bissonette EA, Harrell FE Jr, Lake DE, Moorman JR (2004). Abnormal heart rate characteristics are associated with neonatal mortality. *Pediatr Res*. 55(5): 782-8.
- Grobe AC, Wells SM, Benavidez E, Oishi P, Azakie A, Fineman JR, Black SM (2006). Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290: L1069–L1077.
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. 56: 56–64.
- Guihaire J, Noly P, Schrepfer S, Mercier O (2015). Advancing knowledge of right ventricular pathophysiology in chronic pressure overload: insights from experimental studies. *Arch Cardiovasc Dis*. 108(10):519-29.
- Gutteridge JM (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radical Res Com*. 19: 141–158.
- Harpsøe NG, Andersen LP, Gögenur I, Rosenberg J (2015). Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol*. 71(8): 901-9.
- 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(6): R2234-40.
- Herrera EA, Krause BJ, Ebensperger G, Riquelme RA, Reyes VR, Capetillo M, González S, Parer JT, Llanos AJ (2008). Sildenafil reverses hypoxic pulmonary hypertension in highland and lowland newborn sheep. *Pediatr Res*. 63(2): 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(6): R1676-84.

- Herrera EA, Ebensperger G, Riquelme R, Díaz M, Reyes V, Torres-Farfan C, Llanos AJ (2011). Cardiopulmonary response to stepwise oxygenations in newborn sheep from different altitudes. *Avances en Ciencias Veterinarias.* 26(1-2): 53-63.
- Hessel MH, Steendijk P, den Adel B, Schutte CI, van der Laarse A (2006). Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(5): H2424-30.
- Hislop A, Reid L (1972). Weight of the left and right ventricle of the heart during fetal life. *J Clin Pathol.* 25: 534–536.
- Hislop A (2005). Developmental biology of the pulmonary circulation. *Paediatr Respir Rev.* 6: 35–43.
- Itani N, Skeffington KL, Beck C, Niu Y, Giussani DA (2016). Melatonin rescues cardiovascular dysfunction during hypoxic development in the chick embryo. *J Pineal Res.* 60(1): 16-26.
- Jain A, McNamara PJ (2015). Persistent pulmonary hypertension of the newborn: Advances in diagnosis and treatment. *Semin Fetal Neonatal Med.* 20(4): 262-71.
- Jankov RP, Kantores C, Pan J, Belik J (2008). Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294: L233–L245
- Kane AD, Herrera EA, Camm EJ, Giussani DA (2013). Vitamin C prevents intrauterine programming of in vivo cardiovascular dysfunction in the rat. *Circ J.* 77(10):2604-11.
- Kinsella JP, Abman SH (1995). Recent developments in the pathophysiology and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr.* 126: 853–864.
- Kiserud T (2005). Physiology of the fetal circulation. *Semin Fetal Neonatal Med.* 10: 493–503.
- Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30: 620-650.

- Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PY (1997). Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol.* 272(5): H2327-36.
- López-Alarcona C, Denicola A (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, *Anal Chim Acta.* 763: 1– 10.
- López NC, Ebensperger G, Herrera EA, Reyes RV, Calaf G, Cabello G, Moraga FA, Benaldo FA, Diaz M, Parer JT, Llanos AJ (2016). Role of the RHOA/ROCK pathway in high-altitude associated neonatal pulmonary hypertension in lambs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 310(11): R1053-63.
- Lemler MS, Bies RD, Frid MG, Sastravaha A, Zisman LS, Bohlmeyer T, Gerdes AM, Reeves JT, Stenmark KR (2000). Myocyte cytoskeletal disorganization and right heart failure in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279(3): H1365-76.
- Llanos AJ, Ebensperger G, Herrera EA, Reyes RV, Pulgar VM, Serón-Ferré M, Díaz M, Parer JT, Giussani DA, Moraga FA, Riquelme RA (2011). Fetal and postnatal pulmonary circulation in the Alto Andino. *Placenta.* 32 Suppl 2: S100-3.
- Montgomery MO, Jiao Y, Phillips SJ, Singh G, Xu J, Balsara R, Litvin J (1998). Alterations in sheep fetal right ventricular tissue with induced hemodynamic pressure overload. *Basic Res Cardiol.* 93(3): 192-200.
- Moore LG, Niermeyer S, Zamudio S (1998). Human adaptation to high altitude: regional and life-cycle perspectives. *Am J Phys Anthropol. Suppl* 27: 25-64
- Nair J, Lakshminrusimha S (2014). Update on PPHN: Mechanisms and treatment. *Sem Perinatol.* 38(2):78-91.
- Nigam S, Schewe T (2000). Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1488(1-2): 167-181.
- Nishiyama K, Yasue H, Moriyama Y, Tsunoda R, Ogawa H, Yoshimura M, Kugiyama K (2001). Acute effects of melatonin administration on cardiovascular autonomic regulation in healthy men. *Am Heart J.* 141(5): E9.
- Nolan J, Flapan AD, Capewell S, MacDonald TM, Neilson JM, Ewing DJ (1992). Decreased cardiac parasympathetic activity in chronic heart failure and its relation to left ventricular function. *Br Heart J.* 67: 482–5.

- Papaioannou VE, Verkerk AO, Amin AS, de Bakker JM (2013). Intracardiac origin of heart rate variability, pacemaker funny current and their possible association with critical illness. *Curr Cardiol Rev.* 9(1): 82-96.
- Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU (1999). 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal.* 1(3): 255-284.
- Parrau D, Ebensperger G, Herrera EA, Moraga FA, Riquelme RA, Ulloa CE, Rojas RT, Silva P, Hernandez I, Ferrada J, Diaz M, Parer JT, Cabello G, Llanos AJ, Reyes RV (2013). Store operated channels in the pulmonary circulation of high and low altitude neonatal lambs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 304(8): L540-L548.
- Paulis L, Pechanova O, Zicha J, Barta A, Gardlik R, Celec P, Kunes J, Simko F (2010). Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during L-NAME-induced hypertension. *J Pineal Res.* 48(2): 102-8.
- Peñaloza D, Arias-stella J, Sime F, Recavarren S, Marticorena E (1964). The heart and pulmonary circulation in children at high altitudes: physiological, anatomical, and clinical observations. *Pediatrics.* 34: 568-82.
- Peñaloza D, Arias-Stella J (2007). The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation.* 115(9): 1132-1146.
- Pisoschi AM, Pop A (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;5;97: 55-74.
- Poels EM, da Costa Martins PA, van Empel VP (2015). Adaptive capacity of the right ventricle: why does it fail?. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 308(8):H803-13.
- Poljsak B, Šuput D, Milisav I (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 956792: 2-11.
- Ponikowski P, Anker SD, Chua TP, Szelemej R, Piepoli M, Adamopoulos S, Webb-Peploe K, Harrington D, Banasiak W, Wrabec K, Coats AJ (1997). Depressed heart rate variability as an independent predictor of death in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 79: 1645 – 50.



- Pryor WA, Godber SS (1991). Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radic Biol Med.* 10(3-4): 177-184.
- Rasanen J, Wood DC, Debbs RH, Cohen J, Weiner S, Huhta JC (1998). Reactivity of the human fetal pulmonary circulation to maternal hyperoxygenation increases during the second half of pregnancy: a randomized study. *Circulation.* 97: 257–262
- Recavarren S, Arias-Stella J (1962). Topography of the right ventricular hypertrophy of children native to high altitudes. *Amer J Path.* 41: 467-475.
- Reiter RJ, Tan DX (2003). Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res.* 58(1): 10-9.
- Reiter RJ, Tan DX, Galano A (2014). Melatonin: Exceeding expectations. *Physiology.* 29: 325 – 333.
- Robinson BH (1998). The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J Inherit Metab Dis.* 21(5): 598-603.
- Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 36(1): 1-9.
- Rosenbaugh EG, Savalia KK, Manickam DS, Zimmerman MC (2013). Antioxidant-based therapies for angiotensin II-associated cardiovascular diseases. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 304(11): R917-28.
- Rueda-Clausen CF, Morton JS, Oudit GY, Kassiri Z, Jiang Y, Davidge ST (2012). Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiac siderosis and oxidative stress. *J Dev Orig Health Dis.* 3(5): 350-7.
- Ryan JJ, Archer SL (2014). The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res.* 115(1): 176-88.
- Simko F, Paulis L (2007). Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res.* 42(4): 319-22.
- Singh M, Jadhav H (2014). Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov Today.* 19(9): 1410-8.
- Spear JF, Kronhaus KD, Moore EN, Kline RP (1979). The effect of brief vagal stimulation on the isolated rabbit sinus node. *Circ Res.* 44: 75-88.

- Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP (2012). Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Physiol Rev.* 92: 367-520.
- Tabima D, Frizzel S, Gladwin M (2012). Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Rad Biol Med.* 52: 1970-1986.
- Torres F, González-Candia A, Montt C, Ebensperger G, Chubretovic M, Serón-Ferré M, Reyes R, Llanos A, Herrera E (2015). Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in hypertensive newborn sheep. *J Pineal Res.* 58: 362-373.
- Villamor E, Kessels CG, Ruijtenbeek K, van Suylen RJ, Belik J, de Mey JG, Blanco CE (2004). Chronic in ovo hypoxia decreases pulmonary arterial contractile reactivity and induces biventricular cardiac enlargement in the chicken embryo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287(3): R642-51.
- Walsh-Sukys MC, Tyson JE, Wright LL, Bauer CR, Korones SB, Stevenson DK, Verter J, Stoll BJ, Lemons JA, Papile LA, Shankaran S, Donovan EF, Oh W, Ehrenkranz RA, Fanaroff AA (2000). Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes. *Pediatrics.* 105(1 Pt 1): 14-20.
- Walther, FJ, Wade AB, Warburton D, Forman HJ (1991). Ontogeny of antioxidant enzymes in the fetal lamb lung. *Exp Lung Res.* 17(1): 39-45.
- Wedgwood S, Mitchell CJ, Fineman JR, Black SM (2003). Developmental differences in the shear stress-induced expression of endothelial NO synthase: changing role of AP-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284: L650–L662.

- Wedgwood S, Lakshminrusimha S, Fukai T, Russell JA, Schumacker PT, Steinhorn RH (2011). Hydrogen peroxide regulates extracellular superoxide dismutase activity and expression in neonatal pulmonary hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 15(6):1497-506.

## **ANEXO**

### ***Presentaciones en Congresos y reuniones científicas.***

1. Cantariño R, González-Candia A, Herrera E. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN POSTNATAL DE MELATONINA SOBRE LA FUNCIÓN Y ESTRUCTURA CARDÍACA EN NEONATOS DE OVEJA GESTADOS Y NACIDOS EN HIPOXIA CRÓNICA. Trabajo presentado en la 1° Feria de Grados Académicos de la Escuela de Postgrado y del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Santiago, Chile, abril 2016.
2. Cantariño R, González-Candia A, Herrera E. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN POSNATAL DE MELATONINA SOBRE LA ESTRUCTURA CARDÍACA EN HIPERTENSIÓN PULMONAR ARTERIAL DEL RECIÉN NACIDO. II Congreso Chileno de Hipertensión Arterial. Santiago, Chile, septiembre 2016.

### ***Premios***

1. Premio al mejor trabajo de tesis dentro del programa de magíster en fisiopatología, presentado en la 1° Feria de Grados Académicos de la Escuela de Postgrado y del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.
2. Reconocimiento dentro de los 5 mejores trabajos presentados en el II Congreso Chileno de Hipertensión Arterial.

### ***Financiamiento***

Este estudio fue financiado por los proyectos **FONDECYT Regular 1110595** (*Melatonin therapy for preventing/treating pulmonary hypertension in the high altitude neonate under oxidative stress: a new light for the night hormone*) y **1151119** (*To be born high and flat (Andean Altiplano): healing vascular function and pulmonary arterial hypertension by a combined treatment in neonatal lambs*).