

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



**COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL DE VENAS INTRAPULMONARES PEQUEÑAS A
URIDINA DIFOSFATO ENTRE RATAS CON HIPERTENSIÓN PULMONAR Y RATAS SANAS**

CAROLINA DE LOURDES ORELLANA ÁLVAREZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGISTER EN FISIOLÓGÍA

Director de Tesis: Prof. Dr. Mauricio Henríquez Luna

2018

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

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

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

CAROLINA DE LOURDES ORELLANA ÁLVAREZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Fisiología** en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de Junio de 2018.

Prof. Dr. Mauricio Henríquez Luna

Director de Tesis

Programa de Fisiología, ICBM

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. RODRIGO ALZAMORA

PROF. DR. EMILIO HERERA

PROF. DRA. MARIANA CASAS

Presidente Comisión de Exámen

A mi familia, que es mi mundo...

Y a Danilo por ser mi sol.

Agradecimientos

Han pasado mas de dos años desde el inicio de esta aventura y hoy llegó el momento de pensar en todos aquellos que han aportado en la construcción de este proyecto. Primero debo agradecer a mi profesor y director de Tesis el Dr. Mauricio Henríquez, por abrir las puertas de su laboratorio y de su conocimiento, por poner tanto esfuerzo en ayudar y solucionar situaciones incluso antes de iniciar el primer semestre de clases, por ser capaz de contener a una alumna en ocasiones sobrepasada por el cansancio, por escuchar y por compartir sus experiencias para ayudarme a crecer...infinitas gracias profesor.

Las siguientes líneas están reservadas desde el día en que ingresé al laboratorio y por supuesto no serán suficientes para agradecer cada uno de los momentos en que recibí ayuda por parte de Marcelo Fonseca. Muchas gracias Marcelo porque eres parte fundamental de cada logro en esta tesis, por tu paciencia a diario, por estar ahí en las jornadas completas de trabajo, en las tardes de música y canto y por ser capaz de repetir dos, tres e incluso más veces un procedimiento conmigo.

“El mejor laboratorio por siempre” es la frase que define al maravilloso equipo humano que me acompañó en el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias compañeros por su cariño y apoyo, por aportar desde el área de conocimiento particular, por estar siempre disponibles para ayudar, por las conversaciones de cada tarde y por compartir la felicidad de los pequeños triunfos; muchas gracias Carol, Nicole, Roque, Marisol, Camilo, Francisca y Santiago.

Por supuesto agradezco a mis padres Gladys y Juan Carlos, por ser la base de este constructo que ha sido mi vida, por enseñarme a valorar el esfuerzo y la sencillez, por mostrarme a diario el camino que debo y quiero seguir para cumplir el objetivo de ser algún día, una persona tan completa como ustedes lo son.

Para finalizar quiero agradecer especialmente a quien a caminado cada paso junto a mi en este proceso, Danilo. Por impulsarme al comienzo a iniciar este desafío, por convencerme de que era capaz, gracias por esforzarte junto a mi, por ser paciente, por abrazarme en cada momento de felicidad y levantarme en aquellos de flaqueza y agotamiento. Gracias por entregarme tu seguridad y perseverancia cada vez que la mía ya no alcanzaba y sin duda muchísimas gracias por estar siempre a mi lado, por ser mi mejor amigo y por llenar mi vida de amor.

Financiamiento

Esta tesis ha sido desarrollada con aportes del Laboratorio de Dinámicas Broncovasculares y Daño Pulmonar dirigido por el Dr. Mauricio Henríquez Luna, con financiamiento otorgado por:

- Fondecyt N° 1140468
- ENL029/2017

Abreviaturas

ADP : Adenosina Difosfato

ATP : Adenosina trifosfato

BSA : Bovine serum albumin

CBA : Comité de bioética sobre investigación en animales

CICUA: Comité institucional de cuidado y uso de animales

EC₅₀ : Concentración estimuladora al 50%

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FMUCH: Facultad de Medicina Universidad de Chile

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

HAP : Hipertensión arterial pulmonar

HBSS : Hank's balanced salt solution

HP : Hipertensión pulmonar

IFI : Inmunofluorescencia indirecta

NYHA – FC : New York Heart Association – Functional Classification

NO : Óxido nítrico

PAPm: Presión arterial pulmonar media

PBS : Phosphate buffered saline

PCLS : Precision cut lung slices

P2YR : Receptor purinérgico tipo P2Y

RT – PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

UDP : Uridina difosfato

UTP : Uridina trifosfato

VD : Ventrículo derecho

VI : Ventrículo izquierdo

VIP : Venas intrapulmonares pequeñas

WHO : World Health Organization

Índice

	Pág.
Resumen	11 – 12
Abstract	13 – 14
1.- Marco Teórico	15 – 30
1.1.- Hipertensión Pulmonar	15 – 20
1.1.1.- Clasificación de la hipertensión pulmonar	17 – 18
1.1.2.- Terapia farmacológica y manejo	18 – 20
1.2.- Modelo de hipertensión pulmonar inducido por Monocrotalina	21 – 22
1.3.- Regulación purinérgica del tono vascular	22 – 27
1.3.1.- Nucleótidos y su rol en la circulación intrapulmonar	26 – 27
1.4.- Venas intrapulmonares pequeñas y su importancia en el aumento de la resistencia al flujo	27 – 28
1.5.- Estudio de vasoconstricción venosa en rebanadas de pulmón	28 – 30
2.- Hipótesis	31
3.- Objetivo General	31
4.- Objetivos Específicos	31 – 32
5.- Materiales y Métodos	26 – 30
5.1.- Diseño Experimental	33
5.2.- Animales	34
5.3.- Monocrotalina: Modelo de hipertensión pulmonar en rata	34 – 35
5.4.- Rebanadas de pulmón de corte preciso (PCLS)	35
5.5.- Estudios Funcionales de venas intrapulmonares pequeñas	36 - 37
5.6.- Inmunofluorescencia Indirecta	37 - 38

5.7.- Cuantificación de la colocalización en imágenes marcadas con IFI	38 - 39
5.8.- Análisis Estadístico	39
6.- Resultados	40 – 67
6.1.- Monocrotalina induce HAP en ratas del grupo experimental	40 – 41
6.2.- Respuesta contráctil inducida por K ⁺	42 – 43
6.3.- Curva de dosis respuesta a UDP y valor EC ₅₀	44 – 47
6.4.- Contracción de VIP vía receptor P ₂ Y ₆ : Respuesta frente a agonistas y antagonistas específicos	48 – 49
6.5.- Respuesta de VIP a UDP Glucosa, Agonista específico del receptor P ₂ Y ₁₄	49 – 50
6.6.- Expresión de los receptores P ₂ Y ₆ y P ₂ Y ₁₄ en VIP: Inmunofluorescencia Indirecta	51 – 67
7.- Discusión	68 – 74
8.- Productividad Científica	75
9.- Bibliografía	76 – 82

Resumen

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad crónica, progresiva y fatal. A pesar del desarrollo de nuevas drogas, continúa siendo incurable. Las tres vías de tratamiento farmacológico actual apuntan a la regulación del tono vascular pulmonar, sin embargo, no se ha considerado la posible participación del sistema de regulación purinérgica del tono, el cual ya es conocido por su contribución a la regulación de la vaso-actividad a nivel sistémico. La escasa bibliografía disponible que ha permitido iniciar la caracterización del sistema purinérgico a nivel pulmonar se refiere solo al nivel arterial, sin embargo, los vasos venosos intrapulmonares pequeños dan cuenta de cerca de un 20% de la resistencia vascular pulmonar, lo que hace de este un componente importante en HAP. Es por esto que nuestro objetivo fue evaluar la contracción de venas intrapulmonares pequeñas inducida por UDP y buscar el receptor sensible a UDP involucrado (P_2Y_6 o P_2Y_{14}). Registramos la contracción de venas intrapulmonares pequeñas (VIP) inducida por dosis crecientes de UDP en rebanadas de pulmón de ratas con HAP y ratas sanas; luego desarrollamos ensayos funcionales con agonistas y antagonistas específicos para los receptores P_2Y_6 y P_2Y_{14} y finalmente evaluamos la expresión de dichos receptores a través de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Nuestros resultados muestran por primera vez que el UDP es un agonista capaz de inducir contracción dependiente de concentración en VIP tanto en ratas sanas como HAP, en este último grupo se observa una contracción mediada por UDP de una magnitud mayor a la lograda en ratas sanas. Los estudios funcionales con agonistas específicos para cada receptor muestran contracción mediada por el receptor P_2Y_6 y en muy menor medida por el

receptor P_2Y_{14} en ratas sanas e interesantemente demostramos una hipercontractilidad mediada por UDP-Glucosa a través de su único receptor P_2Y_{14} en ratas HAP. La IFI ratifica la presencia del receptor P_2Y_6 en músculo liso de ratas controles e hipertensas y consecuentemente con los estudios funcionales se demostró una mayor presencia del receptor P_2Y_{14} en músculo liso de VIP de ratas con HAP en comparación a ratas sanas.

Nosotros concluimos que es el receptor P_2Y_{14} el que presenta una destacada participación en la fisiopatología de la HAP; esto debido a que su activación específica induce una respuesta hipercontráctil de las VIP en ratas enfermas, lo cual se ve respaldado por su mayor colocación a nivel del músculo liso en la pared de VIP de ratas HAP. Esto nos permite pensar en el receptor P_2Y_{14} como un nuevo target de acción farmacológica para el tratamiento de la enfermedad.

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a chronic, progressive, and fatal disease. Despite the development of new drugs, the disease remains incurable. The current pharmacological treatment focuses on the regulation of pulmonary vascular tone, but has not been considered the possible participation of the purinergic regulation system of the tone, which is already known for its contribution to vasoreactivity in systemic vessels. There is a limited bibliography available about purinergic system in pulmonary vessels that only refers to the arteries, nevertheless, the small intrapulmonary veins vessels confer approximately 20% of the pulmonary vascular resistance, that make it as an important component in PAH. Our objective was to evaluate the contraction of the small intrapulmonary veins (SPV) induced by UDP and to dissect the susceptible UDP-sensitive P_2Y_6 or P_2Y_{14} . We recorded the UDP - induced contraction of small intrapulmonary veins from lung slices of healthy rats and PAH; then we performed functional assays with specific agonist/antagonist to P_2Y_6 and P_2Y_{14} receptor and finally we evaluated the expression of those receptors through indirect immunofluorescence (IFI). Our results shows for first time that UDP is a physiological agonist capable to induce concentration- dependent contraction of intrapulmonary veins in both healthy and PAH rats. Furthermore, in PAH rats, a greater UDP induced – contraction compared to healthy rats was observed. The functional assays with specific agonists to each receptor shows contraction via P_2Y_6 activation and to a lesser extent via P_2Y_{14} activation in healthy rats and importantly, in PAH rats, we demonstrated an UDP-Glucose- induced hypercontractility mediated by its unique receptor P_2Y_{14} . The IFI confirmed the presence of P_2Y_6 receptor in smooth

muscle of SPV from healthy and PAH rats and consequently in according to the functional assays it was shown a greater presence of P_2Y_{14} receptor in the smooth muscle of SPV from PAH rats in comparison with healthy group.

We conclude that P_2Y_{14} receptor presents a more prominent participation in the physiopathology of PAH; this because its specific activation induced an hyper-response in the SPV of PAH rats, which is supported by a greater P_2Y_{14} colocalization with smooth muscle of SPV from PAH rats. This allows us to postulate to the P_2Y_{14} receptor as a new target of pharmacological action for the disease.

1.- Marco Teórico

1.1- Hipertensión pulmonar

La hipertensión pulmonar (HP) es una enfermedad crónica, progresiva, potencialmente mortal que se define como un incremento en la presión arterial pulmonar media (PAPm) ≥ 25 mmHg en reposo (Humbert y Ghofrani, 2016; Hambly et al., 2016; Galiè et al., 2015), medición que se obtiene por cateterización cardíaca . El término hipertensión arterial pulmonar (HAP) describe a un grupo de pacientes con hipertensión pulmonar (HP) caracterizados hemodinámicamente por la presencia de hipertensión pulmonar pre-capilar (Galiè et al., 2015) definida por una presión de oclusión de arteria pulmonar normal ≤ 15 mmHg y una resistencia vascular pulmonar aumentada > 3 unidades Wood (Humbert y Ghofrani, 2016; Hambly et al., 2016; Galiè et al., 2015; Tsai et al., 2016) y en ausencia de otras causas de HP pre-capilar, formando parte del grupo 1 según la clasificación de la organización mundial de la salud (WHO). La HP es típicamente diagnosticada en pacientes entre los 30 y 60 años de edad y es dos a tres veces más común en mujeres (Hambly et al., 2016). La literatura disponible respecto de la incidencia global de HP es pobre, en el reino unido existe una prevalencia de HP de 97 casos por millón de habitantes, mientras que la prevalencia en Europa para HAP es de 15 casos por millón (Galiè et al., 2015). En Chile se desconoce la prevalencia real de la enfermedad, pero en base a datos del extranjero, se estima que podrían existir 400 a 850 pacientes con HP presentándose unos 30 casos nuevos por año (Zagolín et al., 2016). Los síntomas iniciales son poco específicos y están generalmente relacionados con la disfunción ventricular derecha progresiva. El comienzo es insidioso y los pacientes presentan

fatiga y disnea asociada a ejercicio, a lo cual se suma respiraciones cortas, debilidad, angina y síncope; para progresar en semanas o meses a síntomas en reposo, en estados más avanzados de la enfermedad (Galiè et al., 2015). Este inicio de los síntomas tan poco específico, asociado a la falta de conocimiento de la enfermedad por parte de la población hacen que el diagnóstico habitualmente sea tardío y en etapas avanzadas de la enfermedad, con lo que el pronóstico empeora. Para la HAP se ha estimado una sobrevida desde el diagnóstico de 10 meses para la población pediátrica y 2,8 años para la población adulta (Galiè et al., 2015; Zagolín et al., 2016). El evento inicial para los cambios patológicos observados en la HAP se piensa que se debe a una combinación de insultos genéticos y medioambientales que gatillan alteraciones en las células endoteliales vasculares (Tsai et al., 2016) lo que se ve acompañado por el deterioro de varias vías de señalización (Humbert y Ghofrani, 2016; Gómez-Arroyo et al., 2011). La HAP se caracteriza por una remodelación y progresiva pérdida de las arteriolas pulmonares medianas y pequeñas, un hallazgo común es la presencia de lesiones vasculares multicelulares obliterantes complejas, con un engrosamiento de la capa íntima y media, compuesta principalmente por músculo liso y miofibroblastos (Tsai et al., 2016; Gómez-Arroyo et al., 2011; Shimoda y Laurie, 2013), lo que resulta desde la proliferación y migración de células de músculo liso y trans-diferenciación celular.

1.1.1- Clasificación de hipertensión pulmonar

La hipertensión pulmonar ocurre por muchas razones y más comúnmente como una complicación de enfermedades cardiopulmonares o sistémicas (Hambly et al., 2016). La clasificación según las guías clínicas para el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión pulmonar de las sociedades respiratorias y de cardiología europeas del año 2015 adoptada por la asociación mundial de la salud (WHO), intenta categorizar estas múltiples condiciones clínicas en cinco grupos de acuerdo a su presentación clínica similar, hallazgos patológicos, características hemodinámicas y estrategia de tratamiento (Galiè et al., 2015). Encontramos así el grupo I: Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) con las características hemodinámicas y de remodelación mencionadas previamente, dentro de este grupo es posible identificar la HAP idiopática, hereditaria (asociada a mutaciones genéticas), inducida por drogas y toxinas entre otras. Grupo II: Hipertensión pulmonar debido a falla cardíaca izquierda, la cual puede ser generada por disfunción sistólica o diastólica cardíaca izquierda, enfermedad valvular, cardiomiopatías congénitas y estenosis venosa pulmonar adquirida o congénita. Grupo III: Hipertensión pulmonar debido a enfermedad pulmonar y/o hipoxia, como posibles enfermedades causales se encuentran: la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad pulmonar intersticial, otras enfermedades pulmonares con un patrón mixto obstructivo y restrictivo, desórdenes respiratorios del sueño entre otros. Grupo IV: Hipertensión pulmonar trombo-embólica crónica y otras obstrucciones de arteria pulmonar y en el grupo V: Hipertensión pulmonar con mecanismos poco claros y/o multifactoriales como por ejemplo desórdenes hematológicos como la anemia hemolítica crónica; desórdenes

sistémicos como sarcoidosis, histiocitosis pulmonar, neurofibromatosis; desórdenes metabólicos como la enfermedad de almacenamiento del glicógeno, enfermedad de Gaucher y otros. De esta clasificación, el grupo II y III son los más frecuentes y en ellos la enfermedad suele ser leve o moderada (Hambly et al., 2016; Galiè et al., 2015).

1.1.2.- Terapia farmacológica y manejo

El manejo óptimo de la hipertensión pulmonar depende de distintos factores, entre ellos encontramos el tipo de HP que presenta el paciente (según la clasificación internacional) como también la severidad con la que se presenta la enfermedad, evaluada típicamente según la Clasificación Funcional de la Asociación del Corazón de Nueva York (NYHA-FC). En base a esto es que las guías clínicas internacionales y la WHO recomiendan fuertemente para los grupos II y III que el manejo debiese dirigirse a la optimización de la condición cardiopulmonar subyacente, especialmente hacia la sobrecarga de fluido y la hipoxemia (Hambly et al., 2016). Esto debido a que la evidencia existente no recomienda el uso de terapia objetivo para HP en ellos, ya que se han observado efectos inconsistentes y limitados sobre la hemodinámica pulmonar y la capacidad de ejercicio, sin mejora en los resultados clínicos. En el caso de pacientes que pertenezcan al grupo IV y presenten HP trombo-embólica crónica, el manejo de elección es la endarterectomía de arteria pulmonar, procedimiento quirúrgico que permite retirar el trombo que causa la obstrucción pulmonar (Hambly et al., 2016). Lamentablemente solo un tercio de los pacientes

pertenecientes al grupo IV son candidatos al procedimiento quirúrgico, por lo tanto, en pacientes inoperables o recidivantes las guías internacionales del año 2015 recomiendan el uso de terapia objetivo para HP (Galiè et al., 2015; Hambly et al., 2016). En el caso de la hipertensión arterial pulmonar (HAP) (Grupo I), el objetivo del manejo farmacológico busca aliviar los síntomas relacionados con la HP, prevenir la progresión de la enfermedad, como también mejorar la calidad de vida y la sobrevida de los pacientes, reduciendo la severidad de la anormalidad hemodinámica pulmonar y mejorando la función ventricular derecha (Ataya et al., 2016; Humbert y Ghofrani, 2016). Existe un pequeño grupo de pacientes dentro del grupo I, que en el test de vaso-reactividad realizado por cateterización cardíaca presentan una marcada vasodilatación aguda, sólo en estos pacientes se recomienda iniciar terapia vasodilatadora con altas dosis de bloqueadores de canales de calcio (Hambly et al., 2016; Galiè et al., 2015). En el resto de los pacientes con HAP principalmente se maneja la disfunción endotelial, que está presente como factor central en el desarrollo de la enfermedad y que cursa con disminución en la síntesis de óxido nítrico (NO) y prostaciclina y con una producción aumentada de endotelina 1. Es por esto que la terapia farmacológica disponible para el manejo de la HAP se enfoca en estas tres vías fisiológicas disfuncionantes, por lo que se utilizan como fármacos objetivos los antagonistas del receptor de endotelina 1 (ambrisentan, bosentan, macitentan), prostanoides análogos de la prostaciclina (epoprostenol, treprostinil, selexipag) y fármacos que aumentan los niveles de GMP_c simulando la acción del NO, como inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (sildenafil, tadalafil) o directamente agonistas de la guanilato ciclasa como el Riociguat (Hambly et al., 2016; Tsai et al., 2016; Ataya et al., 2016; Humbert y Ghofrani, 2016). El enfoque más común para

iniciar el tratamiento es la terapia oral única, sin embargo, en algunos pacientes el tratamiento con un solo agente oral está asociado con una inadecuada respuesta inicial o con progresión de la HP y falla ventricular derecha, por lo que datos recientes respaldan el uso de la combinación llamada “triple terapia” usando un agente de cada una de las familias de medicamentos objetivos para HAP (Humbert y Ghofrani, 2016; Hambly et al., 2016). En aquellos pacientes con síntomas persistentes o progresivo deterioro funcional (NYHA- FC III o IV) a pesar de una terapia médica óptima, el doble trasplante pulmonar cardíaco permanece siendo una opción final de manejo que ha demostrado mejorar la supervivencia en aproximadamente 5 años (Hambly et al., 2016).

A pesar del constante desarrollo de nuevos fármacos, la HAP continúa siendo una enfermedad incurable, su tratamiento es aún limitado, el pronóstico a largo plazo es pobre y la mortalidad persiste inaceptablemente alta. Por estos motivos es críticamente necesario el desarrollo de investigación en posibles nuevas vías objetivo de tratamiento para la enfermedad (Gómez- Arroyo et al., 2011; Ataya et al., 2016; Humbert y Ghofrani, 2016).

1.2.- Modelo de hipertensión pulmonar inducido por Monocrotalina

Debido a la aún alta mortalidad asociada a la hipertensión pulmonar y a que los tratamientos utilizados en la actualidad persisten con un modesto impacto en la supervivencia y calidad de vida de los pacientes, se hace necesario de forma crítica un mayor entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad. Para lograr esta tarea, es clave el desarrollo de modelos animales de hipertensión pulmonar (Gómez-Arroyo et al., 2011; Maarman et al., 2013). En este contexto, el uso de la Monocrotalina (60 -80 mg/Kg s.c. o i.v.), un alcaloide derivado de la planta *Crotalaria Spectabilis* ha sido ampliamente utilizado en ratas por su conocida toxicidad pulmonar (Dumitrascu et al., 2008; Shimoda y Laurie, 2013) lo que se asocia a su bajo costo, alta reproductibilidad y habilidades técnicas simples (Gómez-Arroyo et al., 2011; Maarman et al., 2013).

El mecanismo por el cual la Monocrotalina induce hipertensión pulmonar aún no es completamente entendido, sin embargo se sabe que una vez inyectada es activada a un metabolito reactivo en el hígado (acción dependiente de citocromo P450) tras lo cual inicia lesiones a nivel de las células endoteliales de la vasculatura pulmonar lo que gatilla vasculitis pulmonar y remodelación vascular pulmonar obstructiva, caracterizada por estrechamiento y/o obliteración del lumen vascular (Ryan et al., 2011; Gómez-Arroyo et al., 2011; Maarman et al., 2013; Dumitrascu et al., 2008; Shimoda y Laurie, 2013). El modelo de hipertensión pulmonar por Monocrotalina se caracteriza por una hipertrofia de las células del músculo liso de la capa media en arterias pulmonares, con mayor proliferación y resistencia a la apoptosis (Ryan et al., 2011; Gómez-Arroyo et al., 2011; Maarman et al., 2013), generando un aumento en la resistencia al flujo de sangre a través de la red capilar pulmonar, lo que lleva a una

sobrecarga en el ventrículo derecho y su consecuente hipertrofia y posterior falla. Este modelo no solo lesiona las arterias pulmonares, sino que también es capaz de inducir edema alveolar, hiperplasia celular septal alveolar y oclusión de venas pulmonares (Gómez- Arroyo et al., 2011).

Si bien, la hipertensión arterial inducida por Monocrotalina al igual que muchos otros modelos animales, no se ajusta completamente a las características clínicas observadas en humanos, sí presenta las lesiones obliterantes complejas encontradas en pacientes con HAP severa (a diferencia del modelo de hipoxia crónica que también es frecuentemente utilizado) (Gómez- Arroyo et al., 2011) y adicionalmente permite caracterizar etapas tempranas de hipertensión pulmonar que a menudo en humanos se pierden debido al diagnóstico tardío (Maarman et al., 2013).

1.3.- Regulación purinérgica del tono vascular

Por muchos años, el control del tono vascular se entendía exclusivamente bajo el rol antagónico del sistema nervioso autónomo; simpático adrenérgico constrictor y parasimpático colinérgico vasodilatador. Hasta que el Dr. Furchgott descubrió la existencia de un control del tono vascular por factores dependientes de endotelio, lo cual permitió abrir la mirada en este campo (Burnstock, 2010). Existe una larga lista de sustancias vaso-activas endoteliales, las más conocidas son el óxido nítrico, prostaciclina por su capacidad vasodilatadora y endotelina 1 con la función opuesta, sin embargo, también dentro de estos factores liberados desde el endotelio se

encuentran algunos nucleótidos endógenos, lo cual ha iniciado la investigación respecto de la regulación purinérgica del tono vascular.

Las purinas (adenosina, ATP y ADP) y pirimidinas extracelulares (UDP y UTP) son moléculas de señalización que median diversos procesos biológicos que incluyen contracción y plasticidad del músculo esquelético (Casas et al., 2014) contracción del músculo liso y neurotransmisión (Ralevic y Dunn, 2015) secreción endocrina y exocrina, respuesta inmune, inflamación, agregación plaquetaria y dolor entre otros (Ralevic y Burnstock, 1998). En los vasos sanguíneos, estos son liberados desde diferentes tipos celulares (células endoteliales, músculo liso, células epiteliales), como también desde células sanguíneas circulantes incluyendo eritrocitos y plaquetas (Lazarowski et al., 2003; Ralevic y Dunn, 2015). Esta liberación sería en respuesta a estímulos de distintos tipos como estrés tisular, daño celular o en procesos de liberación de ciertos neurotransmisores (Jacobson, 2010).

Los nucleótidos ejercen sus efectos a través de receptores llamados receptores purinérgicos, de los cuales existen dos familias principales: P1 o receptores de adenosina, subdivididos a su vez en cuatro tipos, todos acoplados a proteína G; y receptores P2 que reconocen tanto purinas como pirimidinas con distinta afinidad. Estos receptores se han encontrado en el sistema vascular expresados tanto a nivel de endotelio, músculo liso vascular y en nervios perivascuales (Ralevic y Burnstock, 1998, Ralevic y Dunn, 2015). Los receptores de la familia P2 están divididos en P2X que son receptores ionotrópicos que responden a ATP y actúan como un canal catiónico que causa despolarización de membrana por influjo de calcio (encontramos siete subtipos de receptores P2X1 al P2X7) y el otro grupo son los receptores P2Y

acoplados a proteína G, de los cuales se han identificado ocho distintos que pueden ser clasificados en base a su afinidad con nucleótidos o al tipo de proteína G al cual están acoplados (Ralevic y Burnstock, 1998; Burnstock y Ralevic, 2014; Ralevic y Dunn, 2015). De acuerdo a la estructura del receptor P₂Y encontramos que P₂Y₁₋₂₋₄₋₆₋₁₁ están acoplados a proteína G_q y los receptores P₂Y₁₂₋₁₃₋₁₄ están acoplados a proteína G_i (Ralevic y Dunn, 2015) y respecto del tipo de nucleótido que unen: P₂Y₁ responde a ADP > ATP, P₂Y₂ ATP y UTP, P₂Y₄ responde a UTP, P₂Y₆ a UDP > UTP, P₂Y₁₁ a ATP, P₂Y₁₂₋₁₃ responden a ADP y P₂Y₁₄ a UDP- glucosa > UDP (Jacobson, 2010; Ralevic y Dunn, 2015).

El extenso conocimiento respecto del rol que tiene la recepción purinérgica sobre el tono vascular, se ha generado de forma casi exclusiva en base a estudios realizados en vasos sanguíneos sistémicos y como ha sido mencionado ya por algunos de los autores que más conocimiento han generado en relación al tema, es claro que existen diferencias significativas en los mecanismos regulatorios en diferentes vasos sanguíneos y en diferentes especies, relacionado con el rol fisiológico específico del vaso en particular (Burnstock y Ralevic, 2014) con lo cual, es posible que en la circulación pulmonar la ubicación, función y rol del sistema purinérgico no sea tal como se ha mencionado hasta el momento en base a la circulación sistémica.

En la actualidad existen 3 estudios que han demostrado la relación entre HAP y regulación purinérgica. En el año 2010 Rajkumar y sus colaboradores identificaron un perfil de expresión génica diferencial entre los pacientes con HAP versus controles con más de 13 mil genes involucrados, uno de ellos es el gen que codifica para el receptor P₂Y₁ el que se encontraba sobre expresado en pacientes con HAP, lo cual

fue confirmado posteriormente con análisis de qPCR (Rajkumar et al., 2010). En el año 2015 un grupo de autores finlandeses propuso que la atenuación sostenida de la actividad de la ectonucleotidasa CD39 deriva en la acumulación intravascular de ATP la que estaría altamente asociada con disfunción y remodelación vascular en HAP, esto después de haber encontrado una sub-expresión de CD39 en el endotelio de arterias intrapulmonares de pacientes con HAP idiopática asociado a cambios obstructivos y remodelación en vasos intrapulmonares de ratas, al realizar supresión in vitro de dicha ectonucleotidasa (Helenius et al., 2015). Finalmente en el año 2016 Visovatti y colaboradores publican un estudio llamado “Desregulación purinérgica en hipertensión pulmonar” en el que confirman una disminución en la expresión de CD39 en el endotelio de vasos pulmonares de pacientes con HAP idiopática, agregando que esta subexpresión sería exclusiva a nivel de vasos, dado que su expresión en el epitelio de vía aérea no presenta diferencias respecto de pacientes controles. Adicionalmente encuentran que un modelo de ratón knock-out para CD39 presentan una mayor tasa ATP/Adenosina intravascular, mayor presión de arteria pulmonar, mayor hipertrofia ventricular derecha, un fenotipo protrombótico, asociado a una sobreexpresión de los receptores P_2X_1 y P_2Y_2 en comparación al grupo control (Visovatti et al., 2016). Esta evidencia pone de manifiesto el importante rol de los receptores purinérgicos en el desarrollo de la hipertensión arterial pulmonar, lo cual ha sido demostrado tanto en pacientes como en modelos animales, sin embargo persiste la necesidad de mayor investigación respecto de la expresión, función y distribución de los receptores purinérgicos específicamente en la circulación pulmonar.

1.3.1.- Nucleótidos y su rol en la circulación intrapulmonar

La circulación pulmonar es un circuito de baja presión y baja resistencia, que regula el flujo sanguíneo con el fin último de favorecer el intercambio gaseoso en el parénquima pulmonar (Chootip et al., 2002). Como se mencionó previamente, es escasa la bibliografía sobre la regulación del tono vascular intrapulmonar y su relación con la recepción purinérgica. Sin embargo, gracias al desarrollo de la tecnología farmacéutica y a la aparición de agonistas y antagonistas cada vez más específicos para los distintos tipos de receptores, se han logrado avances en la identificación de la expresión, ubicación y función de los receptores purinérgicos en la circulación intrapulmonar. Un primer acercamiento in vivo fue logrado por Kylhammar y su grupo de estudio en el 2014, en donde observaron que ADP induce vasocontracción pulmonar en cerdos, elevando tanto la presión media de arteria pulmonar como la resistencia vascular pulmonar, esto es logrado por activación de los receptores P_2Y_1 y P_2Y_{12} (Kylhammar et al., 2014). Los estudios realizados en arterias intrapulmonares de ratas han demostrado que ATP, UDP y UTP evocan contracción en arterias pulmonares de ratas, logrando su efecto a través de los receptores P_2Y_2 (ATP y UTP), P_2Y_4 (UTP) y P_2Y_6 (UDP) (Chootip et al., 2002; Chootip et al., 2005; Mitchell et al., 2012). Además gracias al uso de agonistas específicos y a biología molecular, se demostró la presencia de los receptores P_2Y_1 y P_2Y_{12} (ambos sensibles a ADP) en arterias pulmonares de ratas, también induciendo vasocontracción (Mitchell et al., 2012). Este mismo grupo de autores quiso evaluar la presencia en arterias pulmonares de ratas, del receptor P_2Y_{14} que al igual que el receptor P_2Y_6 , responde a UDP; sin embargo, los experimentos realizados con su

agonista específico (UDP – Glucosa) muestran que no existe vasoconstricción dependiente de P_2Y_{14} (Mitchell et al., 2012). Años más tarde se comprobó su presencia y acción vasoconstrictora en arterias coronarias y basilar de ratón (Haanes y Edvinsson, 2014), lo cual nuevamente demuestra que la distribución de los receptores purinérgicos varía dependiendo del tipo de vaso estudiado y que aún esta pendiente mayor investigación, específicamente en el territorio vascular pulmonar.

1.4.- Venas intrapulmonares pequeñas y su importancia en el aumento de la resistencia al flujo

A pesar de que la evidencia presentada previamente es clara en mostrar que los receptores purinérgicos tienen un rol a nivel de la vasculatura pulmonar, hasta la fecha no existen publicaciones que hayan evaluado la regulación del tono de venas intrapulmonares. Esto debido principalmente, a que el estudio de las patologías que comprometen el flujo sanguíneo pulmonar históricamente se ha enfocado en las arterias como posibles responsables, restando valor a la capacidad de las venas intrapulmonares de modificar su diámetro interno y a través de esto participar en el desarrollo de alteraciones de la hemodinamia pulmonar, como ocurre en la hipertensión pulmonar.

Desde el año 1973, se tiene conocimiento claro de la presencia de músculo liso en la pared de venas intrapulmonares, lo cual le confiere la posibilidad de responder de forma dinámica frente a distintos estímulos (Hislop y Reid, 1973). Estos autores también señalan la existencia de una fuerte relación inversa entre el diámetro externo

de las venas y el grosor de su pared, indicando que en venas de menor tamaño (diámetro menor a 300 μm) el grosor de la pared incrementa conforme disminuye su diámetro externo, considerando que más del 57% de los vasos venosos intrapulmonares tienen un diámetro menor a 500 μm (Counter et al., 2013) la contribución que la red venosa pulmonar pudiese presentar en el aumento de la resistencia al flujo de sangre y posterior aumento en la presión de la red vascular pulmonar, es de magnitud considerable y sin embargo, ha sido pobremente discutida.

1.5.- Estudio de vasoconstricción venosa en rebanadas de pulmón

Algunas de las dificultades que se han presentado para el estudio de vasos pulmonares pequeños, por ejemplo venas menores a 200 μm , es el acceso a esos vasos para realizar los experimentos, como también algunas limitaciones inherentes a la técnica utilizada con mayor frecuencia; miografía a partir de anillos vasculares (Chootip et al., 2002; Chootip et al., 2005; Mitchell et al., 2012), como por ejemplo la necesidad de utilizar vasos de mayor tamaño (sobre 200 μm) o la imposibilidad de evaluar la reactividad de la muestra en relación con el tejido en el cual está inmersa, es decir, al ser separada del tejido circundante, la evaluación de la reactividad de ese vaso puede distar del evento en condiciones fisiológicas. Es por esto, que la técnica de rebanadas de pulmón (Precision Cut Lung Slices; PCLS) que ha sido desarrollada en la última década, presenta una ventaja clave al preservar las interacciones funcionales entre vía aérea, arteriolas y venas dentro del parénquima alveolar (Hiorns et al., 2016; Sanderson, 2011). Esta rebanada de pulmón se mantiene “viva”

por alrededor de 3 a 6 días, conservando muchos aspectos de la organización estructural y funcionalidad celular de las porciones de vasos y vía aérea dentro del parénquima alveolar (Sanderson, 2011) e incluso hay registros de que es capaz de mantener sus propiedades funcionales, viabilidad celular y reactividad de la vía aérea tras dos semanas de crio preservación (Rosner et al., 2014).

El hecho de que el PCLS permita observar a través de un microscopio convencional de forma inmediata los cambios dinámicos de contracción y relajación de los distintos componentes de la rebanada en su conjunto y en relación con el microambiente que lo rodea, permite hacer un análisis que considera las fuerzas de retracción de las fibras elásticas, la rigidez del tejido conectivo y las fuerzas estresoras involucradas (Sanderson, 2011).

Utilizando PCLS, se han logrado llevar a cabo en los últimos tres años estudios acerca del efecto de los nucleótidos ATP, UTP y ADP sobre la veno-reactividad pulmonar en ratas con HAP inducida con Monocrotalina. Resultados recientes del Laboratorio de dinámicas broncovasculares y daño pulmonar indican que existe un comportamiento dispar en la venocontricción dependiendo si el agente utilizado es UTP o ADP. Se demostró que el ADP presenta un EC_{50} similar entre ratas sanas y ratas con HAP, sin embargo, el porcentaje de contracción máximo logrado con 800 μ M de ADP fue significativamente menor en ratas HAP ($45,4 \pm 7,3\%$) al compararlas con ratas sanas ($81 \pm 6\%$). Por otro lado los resultados obtenidos con UTP muestran que la máxima respuesta contráctil de VIP no difiere entre ambos grupos, pero sí se observa en este caso una diferencia significativa en el EC_{50} , siendo este valor 16 ± 1 μ M en ratas sanas y $8,8 \pm 1,4$ μ M en ratas con hipertensión pulmonar (Arellano, O.

2016, Sacristán, C. 2015). Con esta evidencia es posible afirmar que en la fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar está importantemente involucrado el control purinérgico vascular, sin embargo, a la luz de los resultados variables que han sido encontrados, es imperativo continuar con el estudio de los efectos de otros nucleótidos; como es el caso del UDP y su receptores P_2Y_6 y P_2Y_{14} en VIP, con el fin de clarificar su participación en esta patología.

2.- Hipótesis

En ratas con hipertensión pulmonar el UDP induce una hiper-contracción de venas intrapulmonares pequeñas, debido a un aumento en la expresión de los receptores purinérgicos P₂Y₆ o P₂Y₁₄.

3.- Objetivo General

Evaluar la contracción de las venas intrapulmonares pequeñas inducida por UDP y evaluar el aumento en la expresión de los receptores purinérgicos P₂Y₆ o P₂Y₁₄, en rebanadas de pulmón de ratas sanas e hipertensas pulmonares.

4.- Objetivos Específicos

4.1.- Objetivo Específico 1

Confirmar la condición de HAP de las ratas del grupo experimental mediante la evaluación de la hipertrofia ventricular derecha a través del índice de Fulton.

4.2.- Objetivo Específico 2

Determinar la concentración EC₅₀ de UDP en venas intrapulmonares pequeñas de ratas, mediante construcción de curvas dosis respuesta a UDP.

4.3.- Objetivo Específico 3

Determinar la respuesta contráctil en presencia de agonistas y antagonistas específicos para P₂Y₆ y P₂Y₁₄.

4.4.- Objetivo Específico 4

Evaluar la expresión del receptor P₂Y₆ y P₂Y₁₄ mediante inmunofluorescencia indirecta.

5.- Materiales y Métodos

5.1.- Diseño Experimental

Tabla 1.- Diseño experimental según cada objetivo específico.

DISEÑO EXPERIMENTAL SEGÚN CADA OBJETIVO ESPECÍFICO	
OBJETIVOS	EXPERIMENTOS
Confirmar la condición de HAP de las ratas del grupo experimental mediante la evaluación del índice de Fulton.	Se midió la relación entre el peso del ventrículo derecho / peso del ventrículo izquierdo + septum en el grupo control, al momento de la eutanasia.
	Se midió la relación entre el peso del ventrículo derecho / peso del ventrículo izquierdo + septum en el grupo experimental, al momento de la eutanasia.
Determinar la concentración EC50 de UDP en venas intrapulmonares pequeñas de ratas, mediante construcción de curvas dosis respuesta a UDP.	Se midió la contracción de VIP inducida por UDP en ratas del grupo control, mediante estudios funcionales y construcción de curva dosis-respuesta
	Se midió la contracción de VIP inducida por UDP en ratas experimentales, mediante estudios funcionales y construcción de curva dosis-respuesta
Determinar la respuesta contráctil en presencia de agonistas y antagonistas específicos para P2Y6 y P2Y14.	Se midió la contracción de VIP inducida por agonista P2Y6 en ratas controles y experimentales, mediante estudios funcionales
	Se midió la contracción de VIP inducida por antagonista P2Y6 en ratas controles y experimentales, mediante estudios funcionales
	Se midió la contracción de VIP inducida por agonista P2Y14 en ratas controles y experimentales, mediante estudios funcionales
Evaluar la expresión del receptor P2Y6 y P2Y14 mediante inmunofluorescencia.	Se detectaron los receptores P2Y6 y P2Y14 por inmunofluorescencia indirecta en rebanadas de ratas sanas y HAP y se cuantificó su colocalización mediante Colocalization Test y Colocalization Threshold

5.2.- Animales

Todos los procedimientos fueron realizados en concordancia con las guías nacionales de manejo de animales y aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales (CICUA) de la Universidad de Chile (Protocolo CBA #0894 FMUCH). Se utilizaron 32 ratas macho, especie *Rattus norvegicus* cepa Sprague – Dawley de edad mayor a 42 – 45 días con pesos entre 200 – 250 grs. Las que fueron eutanasiadas a través de una inyección anestésica de ketamina (180 mg/kg) – xilazina (18 mg/kg) vía intraperitoneal, esta fue administrada con el fin de generar narcosis previo al método físico de eutanasia que corresponde a la apertura torácica bajo anestesia profunda. Los animales se mantuvieron en el bioterio central de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile con temperatura ambiental entre 18 y 23 grados Celsius controlada de acuerdo a las normas de *housing* del bioterio, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con alimentación y agua *ad libitum*, hasta su traslado al laboratorio de dinámicas broncovasculares y daño pulmonar para su eutanasia.

5.3.- Monocrotalina: Modelo de hipertensión pulmonar en rata

Para la preparación de Monocrotalina (Sigma), se utilizaron 300 gr. de este compuesto disueltos en HCl 1 N. El pH fue ajustado a 7,4 con NaOH 0.5 N y el volumen de la solución se completó con agua bidestilada para lograr una concentración de 30 mg/ml. Las ratas individualizadas anteriormente recibieron una inyección subcutánea de 60 mg/Kg de Monocrotalina (grupo hipertensas) o una

inyección subcutánea con volumen equivalente de solución salina (2 ml/Kg) (grupo control). Los estudios se desarrollan entre 21 y 28 días posterior a la inyección con Monocrotalina o solución salina (Maarman et al., 2013; Gómez- Arroyo et al., 2011; Ryan et al., 2011).

5.4.- Rebanadas de pulmón de corte preciso (PCLS)

Durante la disección del animal, la tráquea es canulada para fijar los pulmones con una solución de agarosa de bajo punto de fusión (Axigen) al 2% (dosis 4,5 mg/100 gr) y los vasos sanguíneos intrapulmonares se fijan con 5 ml de gelatina (Becton, Dickinson) al 6% que se inyecta directamente en el ventrículo derecho, ambas mantenidas a 37°C. Posteriormente se solidifican ambas soluciones manteniendo el cadáver por aproximadamente 30 minutos a 4°C, tras lo cual se extraen los pulmones y se corta la base del pulmón izquierdo en su tercio inferior, el que se monta en el vibrátomo que genera aproximadamente 20 rebanadas de 150 µm de grosor (Sanderson, 2011). Las rebanadas son mantenidas en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco; contiene glucosa, L – glutamina, bicarbonato de sodio) en un ambiente a 37°C y con 5% de CO₂. Por aproximadamente 12-20 horas hasta que se realizan los estudios de vaso-reactividad (Henríquez et al., 2018).

5.5.- Estudios Funcionales de venas intrapulmonares pequeñas

Inicialmente se construyó una curva dosis respuesta a K^+ , con el fin de evaluar el comportamiento contráctil de las VIP frente a el, como también para determinar la concentración de normalización a utilizar en los estudios funcionales con agonistas purinérgicos. Para la construcción de esta curva se estimularon VIP con KCl a 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM y 70 mM de concentración. La solución de estimulación alta en K^+ fue preparada reemplazando NaCl con una cantidad equimolar de KCl en HBSS, para así mantener la osmolaridad de la solución. Las curvas de dosis respuesta a UDP fueron construidas con 6 puntos de estimulación a diferentes concentraciones (0,005 μ M –0,05 μ M –0,5 μ M –5 μ M -50 μ M y 500 μ M) (Chootip et al., 2002; Chootip et al., 2005).

Las rebanadas de pulmón también fueron expuestas a agonistas específicos para P_2Y_6 y P_2Y_{14} (PSB0474 y UDP Glucosa respectivamente) a una concentración de 500 μ M, concentración que nos permite comparar la respuesta con la máxima contracción inducida por UDP. Por último, se realizaron adicionalmente estudios funcionales con un antagonista específico P_2Y_6 , MRS2578 100 nM (Mitchell et al., 2012). Todos los estudios funcionales fueron realizados en venas intrapulmonares pequeñas menores a 200 μ m de diámetro observadas y medidas bajo un microscopio invertido de contraste de fase modelo DXS-2 trinocular a 25x. Los registros se realizaron a través de un sistema de fotocaptura con el software S-Viewer que permite obtener las imágenes desde una cámara digital de alta resolución 0,45x modelo SXY – I30 de 3.0M pixeles acoplada al microscopio, que captura fotografías a 0,5 Hz durante todo el proceso de perfusión del sistema.

Dichos registros fueron analizados en el programa de procesamiento y análisis de imágenes ImageJ, que permite determinar en base a los pixeles de cada fotografía el cambio en el área de la vena para cada tiempo del experimento. Posteriormente con los valores del área por segundo, se construyeron los gráficos de registros (área vs tiempo) en el programa estadístico OriginPro 8.1, desde los cuales se obtienen por cada experimento los valores de la máxima reducción de área lograda por cada dosis de UDP utilizada.

5.6.- Inmunofluorescencia Indirecta

Las rebanadas de pulmón que no fueron utilizadas en los estudios funcionales, se lavaron con Phosphate Buffered Saline (PBS, Winkler) 1x para luego ser fijadas con 500 μ L de acetona (Winkler) 100% durante 30 minutos a -20°C . Posteriormente fueron permeabilizadas con Tritón X-100 (Sigma) 0,1% en BSA 3% durante 30 minutos; tras ello fueron incubadas en solución de bloqueo que contiene Bovine Serum Albumin (BSA) 3% en PBS 1x por 2 horas a temperatura ambiente. Luego fueron incubadas de manera independiente con los anticuerpos primarios específicos anti receptor P_2Y_6 (Rabbit) (Alomone) y anti receptor P_2Y_{14} (Rabbit) (Alomone) junto con el anticuerpo anti alfa actina de músculo liso (Mouse) (Santa Cruz), diluidos todos 1:250 en BSA 3% toda la noche a 4°C . En cada lote de inmunofluorescencia indirecta realizado se dejó una placa sin anticuerpo primario, la que sirvió como control negativo de dicha serie. Al día siguiente las rebanadas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 Goat anti Rabbit (Life Technologies) y

Alexa Fluor 633 Rabbit anti Mouse (Life Technologies) diluidos 1:500 en BSA 3% por una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente las rebanadas fueron montadas usando ProLong con DAPI (Life Technologies) y mantenidas a 4°C hasta su estudio. Las imágenes fueron obtenidas en microscopía confocal (Microscopio confocal C2 plus Nikon) con una magnificación de 10x y 40x, realizándose Z Stacknig en cada una de ellas, con cortes de 5 μm (Arellano O., 2016; Henríquez et al., 2018).

5.7.- Cuantificación de la colocalización en imágenes marcadas con IFI

El estudio de colocalización en las imágenes de inmunofluorescencia indirecta, se realizó con el software ImageJ utilizando los plugin “Colocalization Test” que entrega el valor r de la correlación de Pearson entre ambas imágenes estudiadas y “Colocalization Threshold” que entrega como resultado el índice de Manders e intensidad de la fluorescencia de cada imagen.

Dos moléculas marcadas fluorescentemente se consideran colocalizadas si ellas se encuentran en el mismo compartimento espacial, por ejemplo la célula muscular lisa, (Costes et al., 2004) o si ocupan el mismo pixel en una imagen. La colocalización en una imagen que cuenta con fluoróforos de dos colores (en este caso rojo y verde) puede ser visualizada en un gráfico de correlación de dos colores, donde el número de pixeles con intensidades rojas y verdes son dibujados como una nube de puntos, en este gráfico cada eje representa la intensidad de cada color; basados en esto, los pixeles con colocalización significativa deberían encontrarse muy cerca de la línea diagonal que cruza el gráfico (Costes et al., 2004). El valor que entrega el plugin

Colocalization Test es el coeficiente r de la correlación de Pearson (rango de -1.0 a 1.0) en donde un r de -1.0 indica que no hay colocalización y un valor de r igual a 1 refleja una colocalización total. Adicionalmente, el plugin Colocalization Threshold entrega información respecto de la intensidad de la fluorescencia para cada canal, como también arroja el índice de Manders el que puede tomar un valor entre 0 y 1 que indican imágenes que no se sobreponen hasta imágenes con un 100% de sobreposición, respectivamente. Es importante destacar que el valor “M1” indica la proporción de la señal del canal rojo (en nuestro caso anticuerpo anti alfa actina de músculo liso) que coincide con la señal verde (anticuerpo anti receptor purinérgico, P2YR) y el valor “M2” corresponde a la proporción de la señal del canal verde que coincide con el rojo (Manders et al., 1993).

5.8.- Análisis Estadístico

Para cada uno de los resultados, la contracción lograda por el agonista estudiado fue normalizada por la contracción máxima lograda por 50mM de K^+ . En cada experimento se realizó un mínimo de 3 y máximo 30 registros. Los resultados son mostrados como la mediana y el rango (Min. Y Max) o como la media \pm S.E.M. (standard error of the mean) para el caso de las curvas dosis - respuesta. Para los análisis se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 y la significancia estadística se analizó con la prueba no-paramétrica de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos y Kruskal Wallis para comparaciones en más de dos grupos. Para el análisis de los datos, se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

6.- Resultados

6.1.- *Monocrotalina induce HAP en ratas del grupo experimental.*

Debido a que es fundamental confirmar que en nuestro grupo experimental se está cumpliendo la condición de enfermedad, es que nos planteamos como objetivo inicial corroborar dicha condición en nuestros animales del grupo HAP mediante el índice de Fulton, el cual relaciona el peso del ventrículo derecho (VD) con el peso del ventrículo izquierdo más el septum (VI + septum) y de esta manera logra identificar la presencia de hipertrofia del ventrículo derecho del corazón, como consecuencia de un aumento en la resistencia vascular pulmonar. El grupo control presentó un índice de Fulton con una mediana de 0,23 (Min. 0,17 – Max. 0,39) (n= 9) el cual fue significativamente mayor en el grupo HAP con una mediana de 0,55 (Min. 0,31 – Max. 0,76) (n=12) $p= 0,0003$ (Figura 1). En la tabla 2 se detallan por separado los pesos del ventrículo derecho y del ventrículo izquierdo + septum, se aprecia que sólo el peso del ventrículo derecho presenta diferencias significativas entre grupos ($p= 0,0001$) lo que nos permite inferir que el aumento en la resistencia al flujo sanguíneo inducido por la Monocrotalina es específico a nivel del circuito pulmonar y no se presentaría a nivel de los vasos sistémicos (peso del VI para ambos grupos sin diferencias significativas). Se adicionan datos relacionados con la condición de enfermedad presentada en los animales como son el peso corporal al día de la eutanasia y el peso de los pulmones, para cada grupo.

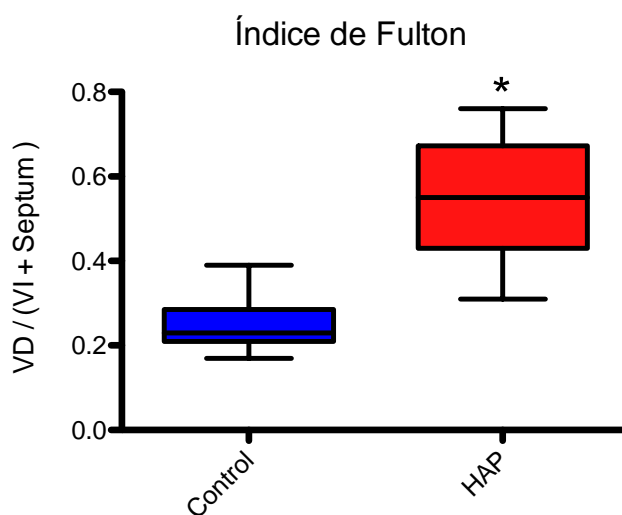


Figura 1.- Se grafica índice de Fulton en grupo de ratas controles n= 9 y ratas con HAP n= 12. Se muestra la mediana y el rango. * Diferencia significativa según Mann- Whitney test $p = 0,0003$.

Tabla 2.- Caracterización animales del grupo control y grupo experimental

Variable	Controles (n=15)	HAP (n=17)	Valor p
	Mediana (Min. – Max.)	Mediana (Min. – Max.)	
Peso inicial (gramos)	239 (194 – 256)	238 (191 – 334)	0,9082
Peso día eutanasia (gramos)	460 (371 – 531)	397 (304 – 488) *	0,0212
Peso pulmones (gramos)	24,3 (22,3 – 26,0)	24,4 (23,8 – 25,2)	0,8857
Peso pulmones/ gr. Peso corporal	0,048 (0,047 – 0,049)	0,052 (0,052 – 0,059)*	0,0286
Peso ventrículo derecho (mg)	229 (134 – 255)	478 (324 – 793)***	0,0001
Peso ventrículo izquierdo + septum	885 (651 – 1095)	893 (691 – 1191)	0,7223
Índice de Fulton	0,23 (0,19 – 0,39)	0,55 (0,31 – 0,76)***	0,0003

* Diferencia significativa según Mann- Whitney test $p < 0,005$.

6.2.- Respuesta contráctil inducida por K^+

La figura 2 muestra la curva dosis respuesta a K^+ en la que es posible observar que a concentraciones entre 5 y 30 mM se obtiene una mínima respuesta contráctil, que se acentúa notoriamente a 50 mM con una contracción cercana al 72%, para posteriormente en 70 mM lograr una oclusión completa del lumen. Si bien es 70 mM la concentración que logra la máxima contracción de las VIP, lo que se observó con frecuencia en los experimentos realizados es que posterior a esta oclusión completa del lumen, el vaso es incapaz de relajarse nuevamente hasta su lumen inicial (figura 3) condición necesaria para la realización de los estudios funcionales propuestos en esta investigación. Por este motivo, la normalización fue realizada con K^+ 50 mM que logra una contracción sub-máxima con relajación casi completa post contracción.

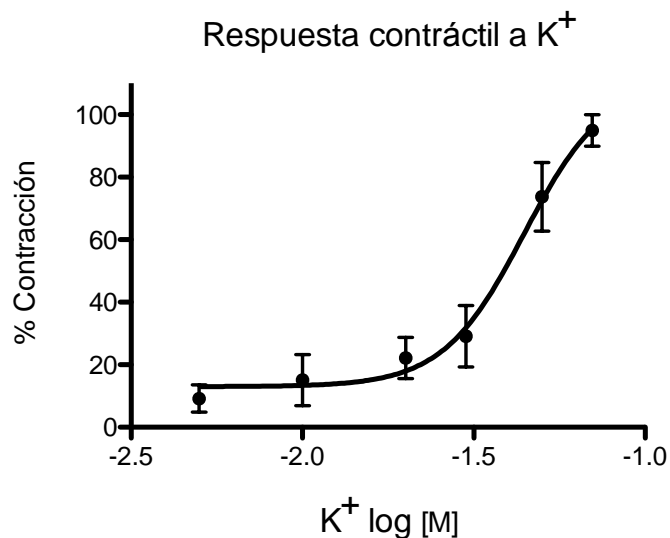


Figura 2. Curva dosis respuesta a K^+ en VIP de ratas controles $n= 3$, cada punto muestra la media \pm S.E.M.

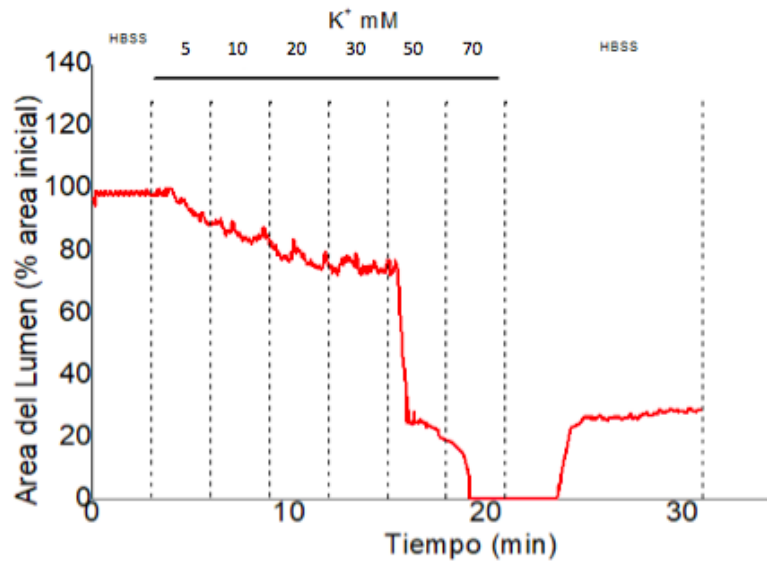


Figura 3. Registro representativo de la contracción inducida por K^+ en una VIP de rata control.

Adicionalmente, determinamos si la respuesta contráctil a K^+ se ve modificada en el grupo de ratas experimentales con HAP, para esto comparamos la contracción inducida por 50 mM de K^+ en el grupo de ratas controles que corresponde a 51,4% (Min. 37,9% – Max. 75,3%) versus la contracción lograda en HAP que fue de 54,9% (Min. 35,5% – Max. 71,7%), sin diferencias significativas con un $p=0,6$ (Figura 4).

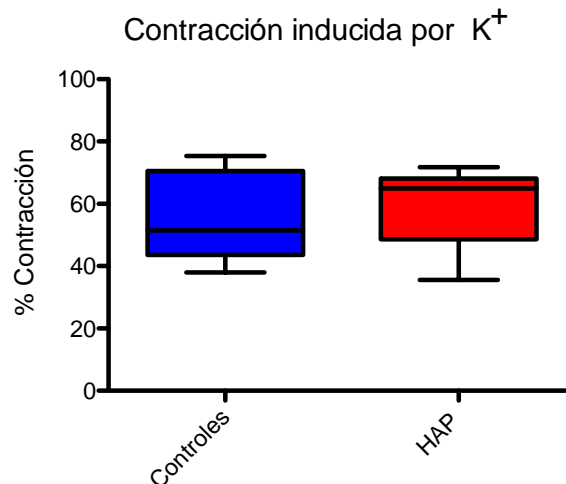


Figura 4. Contracción de VIP inducida por 50 mM de K^+ en ratas controles $n=11$, caja azul y ratas HAP $n=9$, caja roja. Se muestra la mediana y el rango, $p= 0,4$.

6.3.- Curva de dosis respuesta a UDP y valor EC_{50} .

Nuestros resultados muestran que el agonista UDP logra inducir contracción en venas intrapulmonares pequeñas de ratas sanas y con HAP. En la figura 5 se observa una VIP de una rata control, que mide aproximadamente 120 μm de diámetro en reposo, es decir, mientras estaba siendo perfundida con solución salina fisiológica (Imagen 2-A), en la imagen 2-B se muestra una reducción considerable en el tamaño del lumen cuando la VIP se expone a una solución que contiene 50mM de KCl, posteriormente el tejido es perfundido con soluciones que contienen concentraciones crecientes de UDP (desde 0,005 a 500 μM) durante 3 minutos por cada solución, para determinar si la respuesta contráctil es dependiente de concentración (Figuras 2-C a 2-H), encontrándose una evidente disminución del lumen desde 0,5 μM en adelante. En la figura 6 se muestran dos registros representativos de experimentos como el de la figura 5, realizados en una VIP de rata control (línea negra) y rata HAP (línea roja). En estos se observa que la contracción es mayor a medida que aumenta la concentración de UDP en la solución perfundida y por lo tanto se hace evidente la dosis dependencia de la respuesta estudiada.

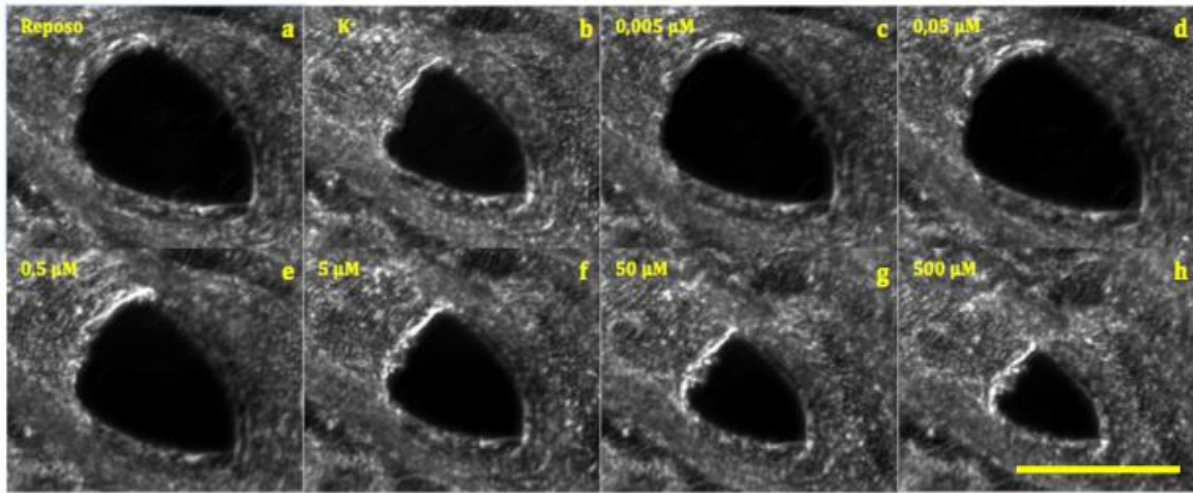


Figura 5. Imágenes representativas de una vena pulmonar pequeña (VIP) de rata control, frente a dosis crecientes de UDP. Barra amarilla=100μm.

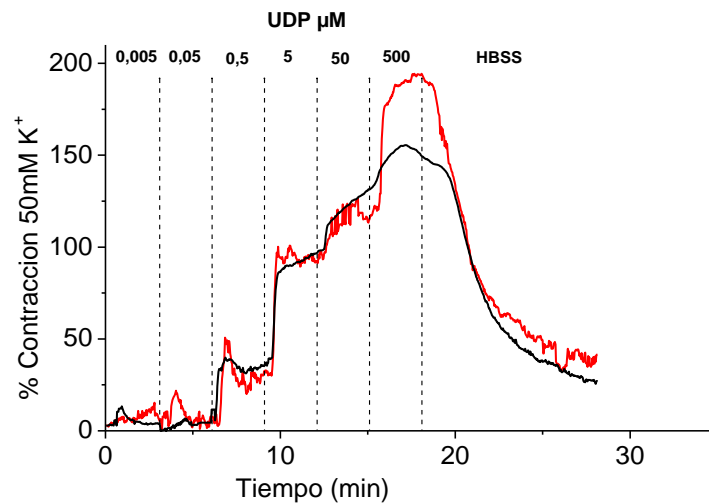


Figura 6. Registro representativo de la dosis dependencia a UDP de una VIP de rata control (línea negra) y rata HAP (línea roja). Se muestra la respuesta contráctil a UDP normalizada por una pre-contracción inducida por 50mM de KCl.

La figura 7 muestra la cuantificación de la respuesta a UDP en ambos grupos. Se observa en la figura 7-A la curva dosis respuesta a UDP en VIP de ratas sanas (línea azul) y ratas HAP (línea roja). En el gráfico se puede observar que la curva del grupo control describe un ajuste sigmoideo el cual permite interpretar que a bajas concentraciones se logra una contracción cercana al 25% (normalizada por K^+), posteriormente a concentraciones intermedias presenta un marcado ascenso y sobre 50 μM alcanza un plateau contráctil. De los parámetros obtenidos del ajuste es posible calcular el valor de la concentración estimuladora al 50% (EC_{50}) para el UDP, que en ratas sanas corresponde a $2,45 \pm 0,33 \mu M$ normalizado por 50 mM de K^+ . La curva dosis respuesta a UDP en ratas con HAP (línea roja) mostrada en la figura 7-A presenta un comportamiento diferente; a concentraciones de 0,005 μM , 0,05 μM , 0,5 μM , 5 μM y 50 μM la contracción observada es similar a la que presentan ratas sanas, sin embargo en la máxima concentración analizada se obtuvo una contracción superior (235,7%; Min. 143,1% – Max. 739,4% n= 7, ratas HAP) y significativamente diferente a la de ratas controles (127,8%; Min. 70,9% – Max. 198% n= 7, ratas control) $p= 0.035$. Para apreciar de mejor forma esta diferencia, la contracción frente a 500 μM de UDP fue graficada de manera independiente en la figura 7-B. Es justamente esta potente contracción que se genera en el punto final del rango de concentraciones testeado, la que impide un ajuste sigmoideo de la curva en el grupo de ratas con hipertensión arterial pulmonar.

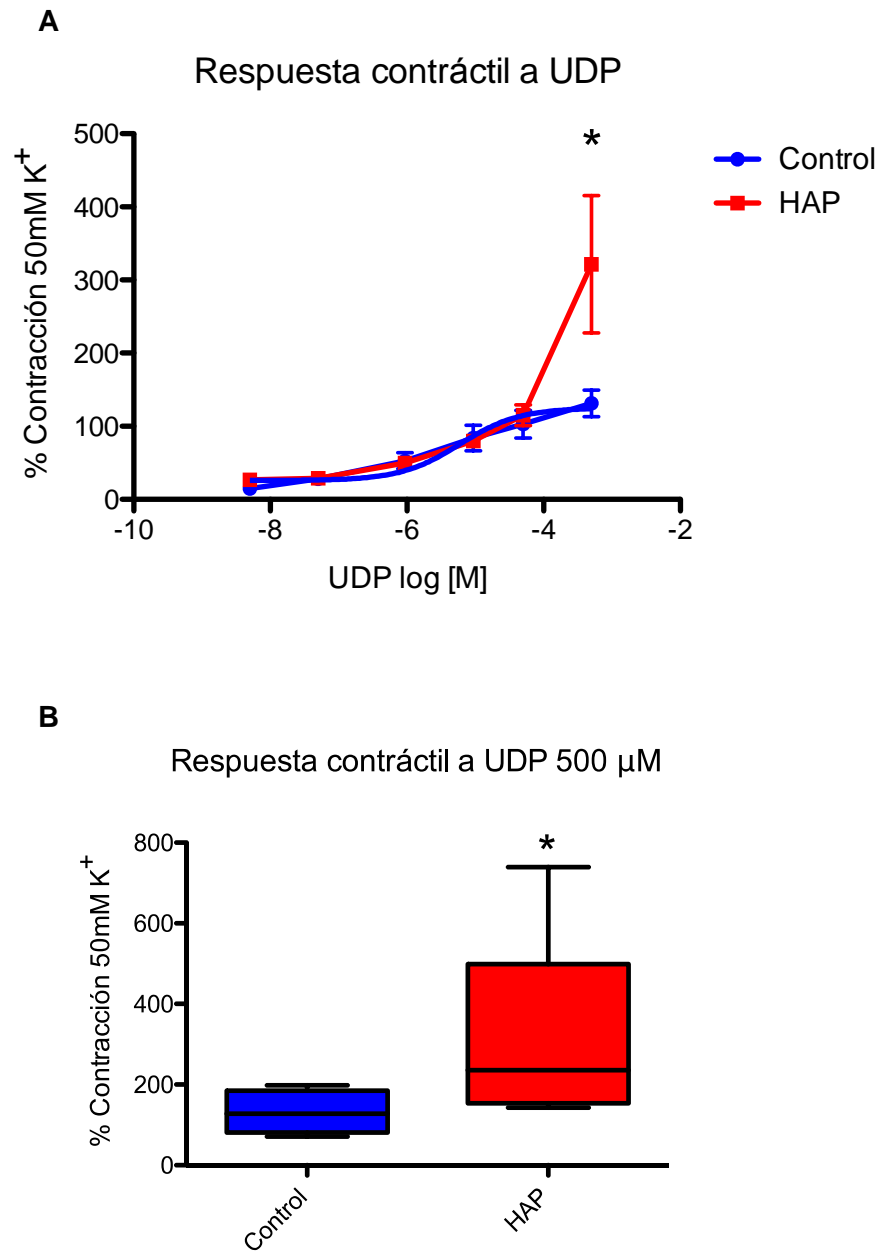


Figura 7. Dosis Dependencia en respuesta a UDP. A.- Curvas dosis respuesta a UDP en ratas controles (curva azul) $n=7$ y ratas HAP (curva roja) $n=7$, cada punto muestra la media \pm S.E.M. B.- Contracción de VIP inducida por 500 μ M de UDP en ratas controles $n=7$ (caja azul) y ratas HAP $n=7$ (caja roja). Se muestra la mediana y el rango. *Diferencia significativa según Mann-Whitney test, $p=0,035$.

6.4.- Contracción de VIP vía receptor P_2Y_6 : Respuesta frente a agonistas y antagonistas específicos.

Dado que existen dos receptores sensibles a UDP, esta investigación busca dilucidar cuál de dichos receptores está presente en la respuesta que observamos, tanto en las ratas sanas como en las ratas HAP. Inicialmente realizamos estudios funcionales en VIP con agonistas y antagonistas específicos para el receptor P_2Y_6 . Observamos que al estimular con PSB0474 un potente y selectivo agonista del receptor P_2Y_6 a una concentración de 500 μ M se produce una contracción en el grupo de ratas con HAP (591%; Min. 226% – Max. 764%, n= 3) que tiende a ser superior respecto de ratas controles (106%; Min. 90% – Max. 566%, n=3), pero sin diferencia significativa (figura 8) $p= 0,2$. Para determinar el efecto de MRS2578, antagonista específico del receptor P_2Y_6 , se calculó el porcentaje de inhibición respecto de la contracción máxima lograda por 500 μ M de UDP (en cada uno de los experimentos) tomando esta como 100% de contracción. El gráfico de la figura 9 muestra la respuesta contráctil a UDP en presencia del antagonista (MRS2578 100 nM) tanto para ratas controles (69%; Min. 31% – Max. 94%, barra negra n=4) como para ratas HAP (84%; Min. 31% – Max. 135%, barra roja n =3), mostrando que existe una inhibición efectiva de la contracción al antagonizar el receptor P_2Y_6 y además que dicha inhibición tiende a ser menor en ratas HAP versus ratas controles, diferencia no significativa $p= 0,85$.

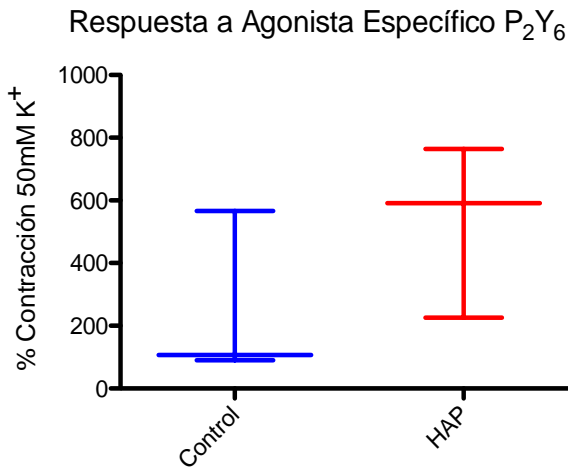


Figura 8. Estimulación de VIP con 500 μ M de PSB0474, agonista específico del receptor P₂Y₆, n= 3. Se muestra la mediana y el rango, $p=0,2$.

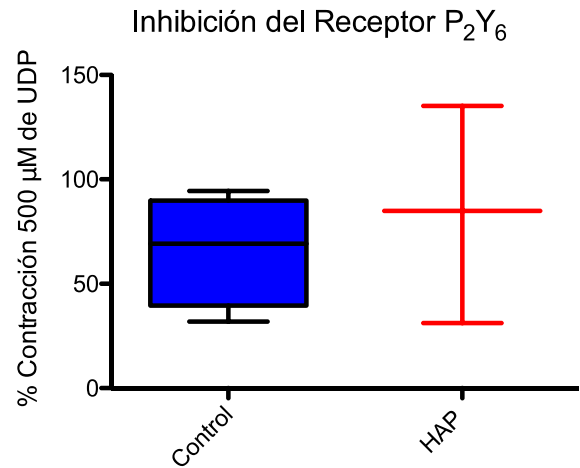


Figura 9. Inhibición de la respuesta contráctil a UDP 500 μ M en VIP por MRS2578, Control n=4, HAP n = 3. Se muestra la mediana y el rango. $p=0.85$

6.5.- Respuesta de VIP a UDP Glucosa, Agonista específico del receptor P₂Y₁₄.

La presencia y funcionalidad del receptor P₂Y₁₄ en venas intrapulmonares pequeñas de rata fue testada mediante la utilización de su agonista específico UDP-Glucosa. Al analizar la respuesta de las VIP en la máxima concentración de UDP Glucosa utilizada (500 μ M) los resultados muestran que en ratas controles este agonista induce una leve respuesta, la contracción registrada presenta una mediana de 5,7%; Min. 0,2% – Max. 39,2% (n= 4 ratas, correspondiente a 10 experimentos; Figura 10), sin embargo, al estimular VIP de ratas HAP con UDP-Glucosa en igual concentración se evidencia una contracción de magnitud 68,2%; Min. 32,5% – Max. 89,9% normalizada por K⁺ (n=4, correspondiente a 7 experimentos; Figura 10) la cual es significativamente mayor con un $p= 0,02$.

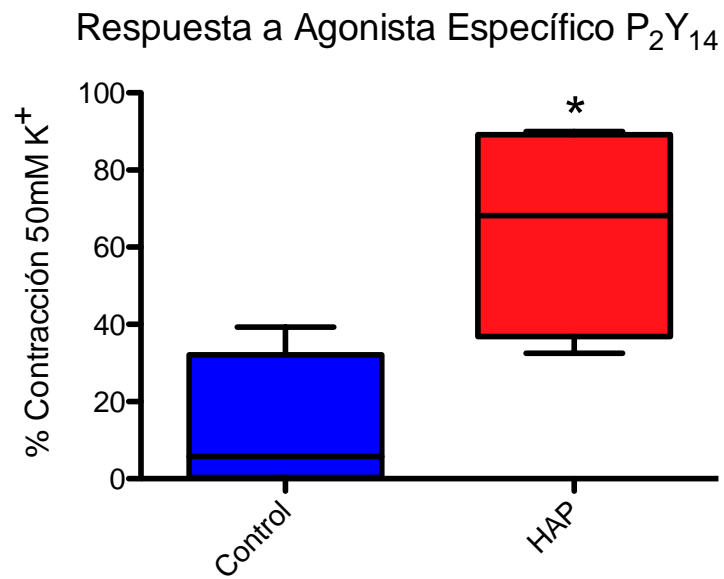


Figura 10. Cuantificación de la respuesta a UDP – Glucosa 500 μ M en VIP. Ratas controles n= 4 (caja azul) y ratas HAP n= 4 (caja roja). Se muestra la mediana y el rango. * Diferencia significativa según Mann-Whitney test, $p=0,02$.

6.6.- Expresión de los receptores P_2Y_6 y P_2Y_{14} en VIP: Inmunofluorescencia Indirecta.

Para evaluar la expresión de los receptores P_2Y_6 y P_2Y_{14} , realizamos inmunofluorescencia indirecta sobre VIP en rebanadas de pulmón de ratas control y ratas con HAP. Marcamos además de los receptores purinérgicos, alfa actina específica de músculo liso para obtener información acerca de la localización de los mismos. Las imágenes fueron obtenidas en microscopía confocal (Microscopio confocal C2 plus Nikon) con una magnificación de 10x y 40x, en donde se realizó un Z Stacking de las muestras, con cortes ópticos de 5 μm de grosor. En la figura 11 se muestran las imágenes del control negativo sin anticuerpos primarios. Este control se realizó para demostrar que no hay unión inespecífica de los anticuerpos secundarios utilizados y por lo tanto las señales observadas en las imágenes posteriores corresponden a uniones específicas del anticuerpo primario con su proteína respectiva. Como se observa en la figura 11-B y 11-C no existe fluorescencia evidente en las imágenes del control negativo y bajo el mismo “setting” para adquirir estas imágenes confocales, es que se analizaron todas las imágenes posteriores.

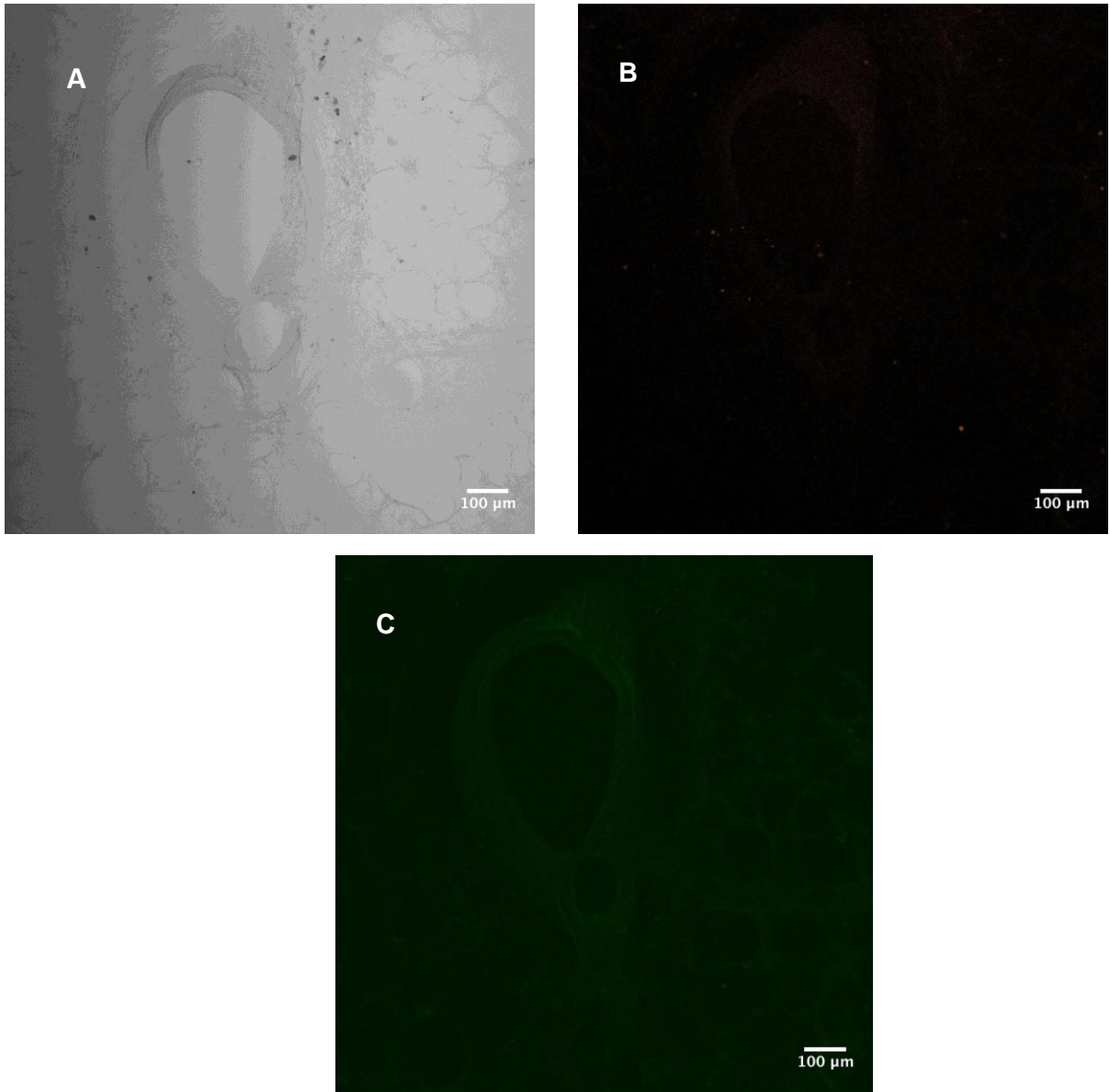


Figura 11. Control Negativo para anticuerpos secundarios. (A) Contraste de fase de una rebanada de pulmón que muestra una VIP (B) Imagen de la rebanada mostrada A, incubada sin anticuerpo primario y con anticuerpo anti-Goat Alexa Fluor 633 como anticuerpo secundario. (C) Imagen de la rebanada mostrada en A, incubada sin anticuerpo primario y con anticuerpo anti-Rabbit Alexa Fluor 488 como anticuerpo secundario.

En la figura 12 se observan las imágenes de inmunofluorescencia para el receptor P_2Y_6 y alfa actina de músculo liso en una VIP de rata control. En la imagen de contraste de fase (Figura 12-A) es posible identificar las estructuras de una VIP, visualizando el lumen del vaso (flecha blanca), la pared del vaso (flecha roja) y también es posible observar los espacios aéreos que corresponden a alveolos del parénquima pulmonar (flechas negras).

La figura 12-B muestra la celularidad marcada por medio del uso de DAPI indicando la posición de los núcleos celulares, que coincide con la pared del vaso y que se hace nula en la zona del lumen. En la figura 12-C se observa la fluorescencia generada por el anticuerpo anti alfa actina de músculo liso (en rojo), esta marca coincide con la zona en que se observa la pared del vaso en la imagen 12-A y 12-B. Se aprecia que la alfa actina de músculo liso presenta una distribución fibrilar alrededor del lumen del vaso.

La fluorescencia originada debido a la unión específica del anticuerpo anti P_2Y_6 y su respectivo anticuerpo secundario se observa en la figura 12-D en verde, el cual presenta una distribución similar a la observada en las imágenes 12-A, B y C lo cual nos indica que efectivamente dicho receptor está presente en la pared de la VIP.

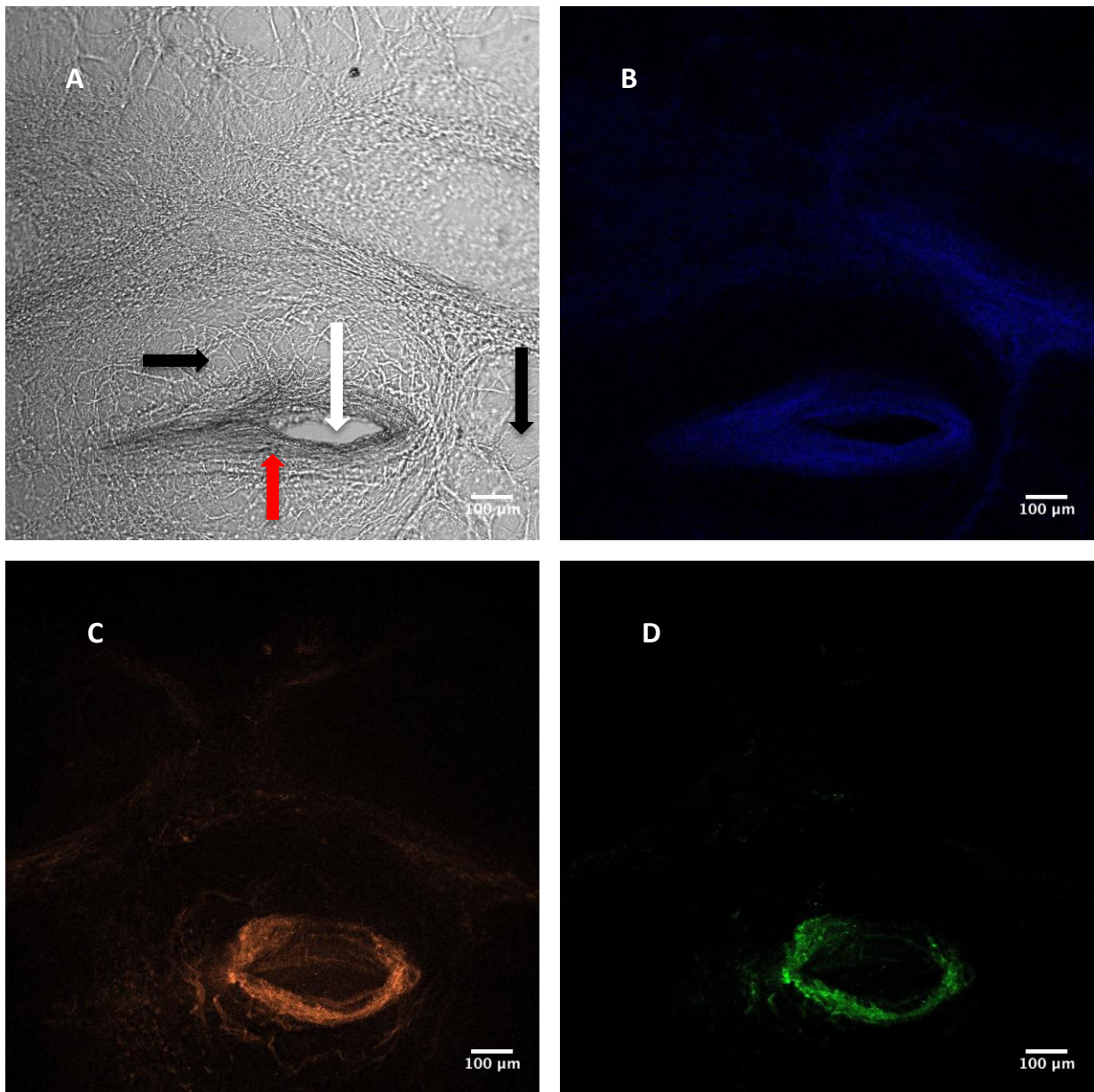


Figura 12. Imagen confocal de una rebanada de pulmón que muestra a P_2Y_6 en VIP de una rata Control, corte óptico de 5 μm . (A) Contraste de fase de la rebanada (B) Imagen de la rebanada mostrada en A, con marca DAPI (C) Imagen de la rebanada mostrada en A, marcada con anticuerpo específico para alfa actina del músculo liso, (D) Imagen de la rebanada mostrada en A, marcada con anticuerpo específico para receptor P_2Y_6 . Flecha blanca= lumen del vaso, flecha roja= pared del vaso, flechas negras= espacios alveolares del parénquima pulmonar.

Al realizar la superposición de las imágenes para ambos fluoróforos es posible observar que en gran parte de la pared vascular las señales coinciden, lo que se observa en color amarillo, a esto llamamos zonas de colocalización (Figura 13). Para hacer más objetiva esta observación, se cuantificó el grado de colocalización mediante los plugin *Colocalization Test* y *Colocalization Threshold* del programa ImageJ (ver sección Materiales y Métodos).

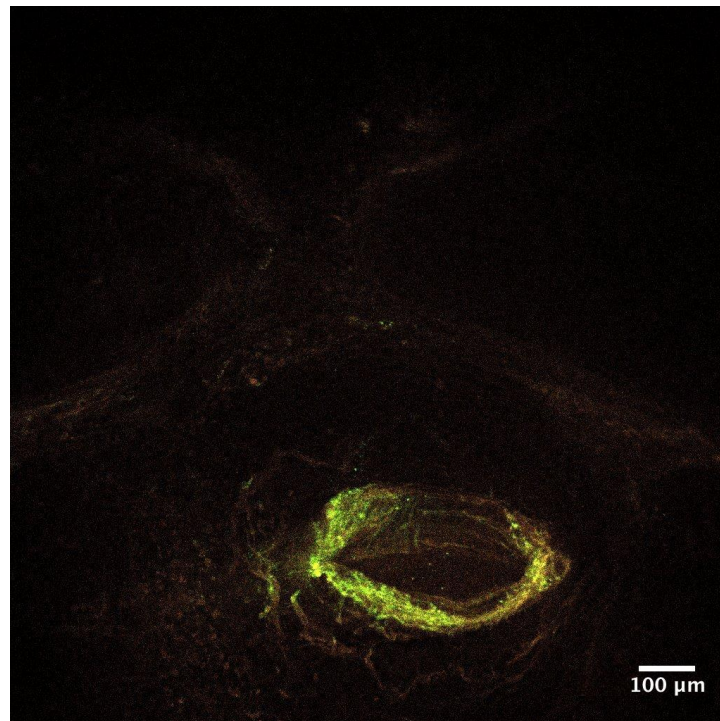


Figura 13. Superposición de la imagen de VPP marcada con anticuerpo específico para el receptor P₂Y₆ y marcada con anticuerpo específico para alfa actina del músculo liso. Corte óptico de 5 μm.

Los test de colocalización para la imagen de la figura 13 arrojaron un coeficiente r de correlación de Pearson de 0,61, un índice de Manders M1= 0,59 y M2= 0,78. Lo cual nos permite concluir que ambas proteínas colocalizan en el músculo liso de la pared del vaso, con lo que se demuestra que el receptor P₂Y₆ está presente en VIP de

ratas controles, adicionalmente, el porcentaje de intensidad de la fluorescencia emitida por el anticuerpo anti P_2Y_6 en la VIP de una rata control corresponde a 73%.

En la figura 14 se observan las imágenes de inmunofluorescencia por microscopía confocal para visualizar la expresión del receptor P_2Y_6 y alfa actina de músculo liso en un rata HAP. La imagen en contraste de fase (figura 14-A) muestra la estructura de una VIP de rata HAP en la que se visualiza la pared del vaso (flecha roja) y el lumen en el centro (flecha blanca), en medio de espacios aéreos correspondientes a alveolos del parénquima pulmonar. La imagen 14-B marcada con DAPI, coincide con lo que corresponde al espesor de la pared y también existe falta de celularidad en el lumen del vaso (flecha blanca). En la figura 14-C se observa la marca generada por el anticuerpo anti alfa actina de músculo liso (en rojo), es posible identificar una pérdida de continuidad de las fibras musculares lisas en el cuarto inferior derecho de la VIP, pero sin pérdida de tejido como se observa en la imagen de contraste de fases (Figura 14-A) al comparar con la fluorescencia verde que representa al anticuerpo anti P_2Y_6 (Figura 14-D) existe en esta misma zona una disminución de la señal para dicho receptor, lo cual apoya la hipótesis de la colocación P_2Y_6 con el músculo liso de la pared de VIP. En efecto, la fluorescencia del receptor P_2Y_6 coincide con la de la alfa actina de músculo liso al realizar la superposición de ambas imágenes (Figura 15). En este caso los test de colocación realizados para la imagen de la figura 15 indicaron que el coeficiente de correlación de Pearson es de 0,7, el índice de Manders $M1= 0,80$ y $M2= 0,82$, reflejando que existe una colocación real entre el receptor P_2Y_6 y la alfa actina de músculo liso en las

paredes de las venas de ratas HAP. En este caso el porcentaje de intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo anti P₂Y₆ corresponde a 78%.

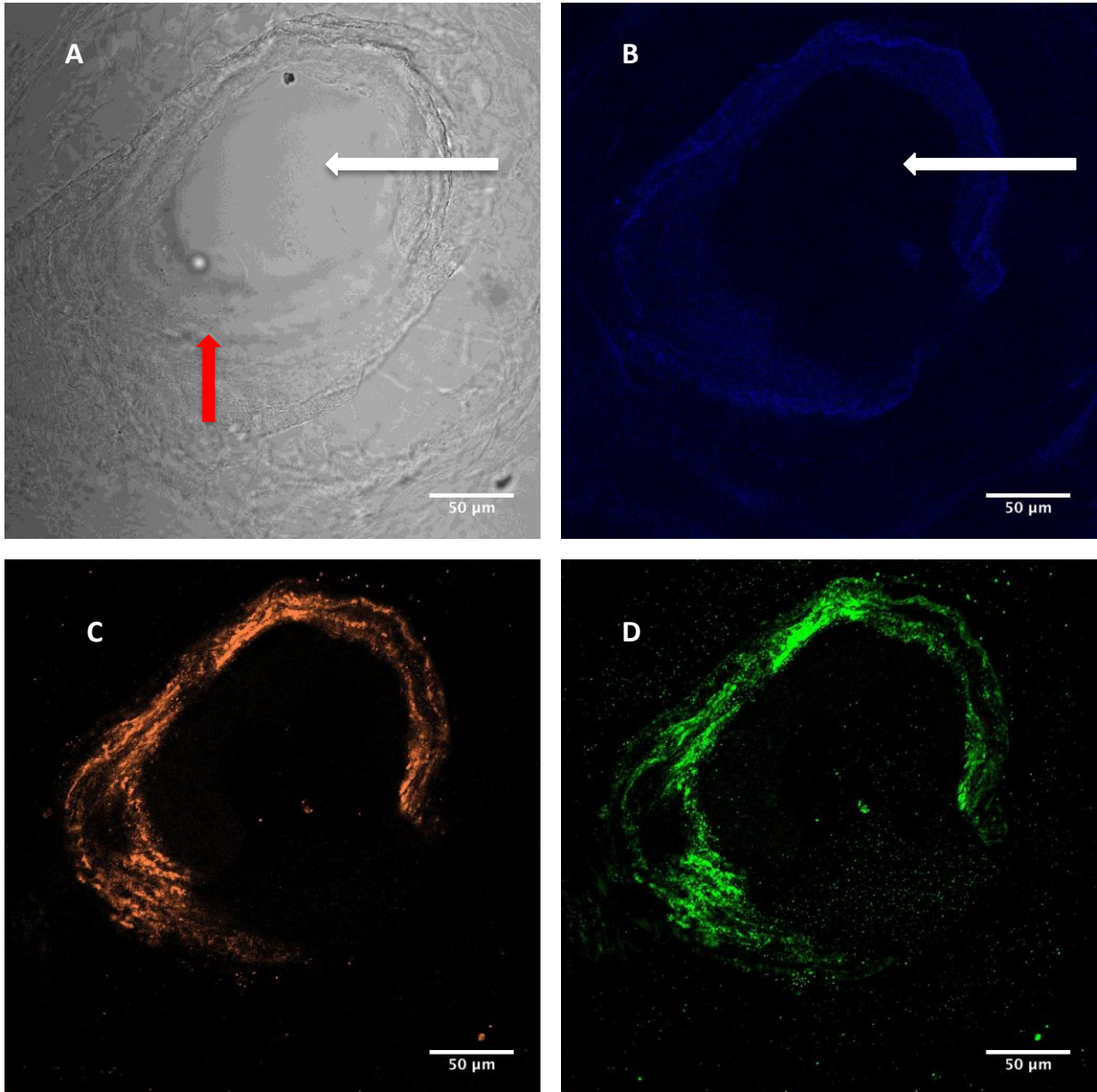


Figura 14. Imagen confocal de una rebanada de pulmón que muestra a P₂Y₆ en VIP de una rata HAP, corte óptico de 5 μ m. (A) Contraste de fase de la rebanada (B) Imagen de la rebanada mostrada en A, con marca DAPI (C) Imagen de la rebanada mostrada A, marcada con anticuerpo específico para alfa actina del músculo liso (D) Imagen de la rebanada mostrada en A, marcada con anticuerpo específico para receptor P₂Y₆. Flechas blancas= lumen del vaso, Flecha roja= pared del vaso.

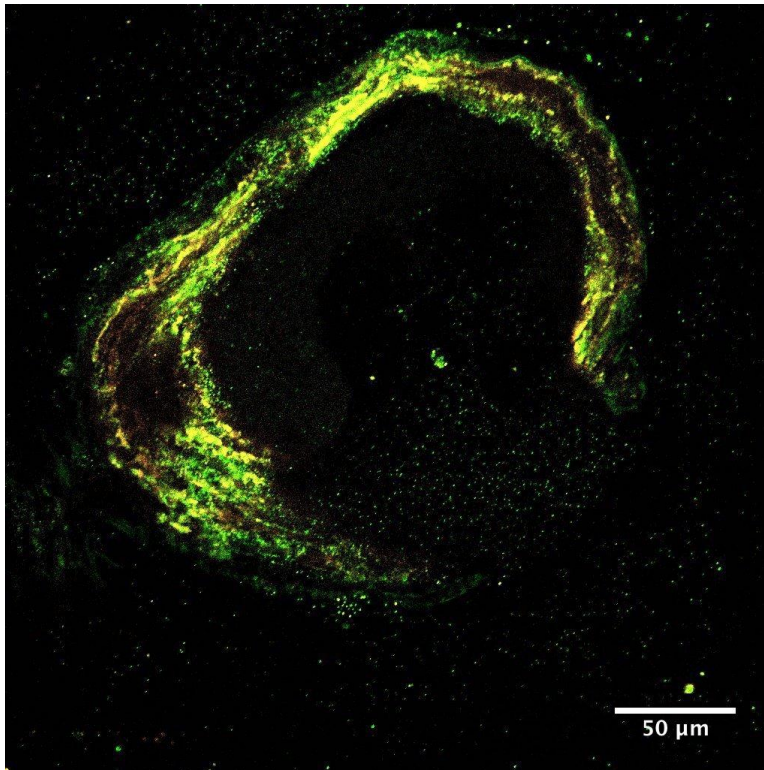


Figura 15. Superposición de la imagen de VIP marcada con anticuerpo específico para receptor P2Y6 y marcada con anticuerpo específico para alfa actina del músculo liso. Corte óptico de 5 μm.

En la figura 16 se muestra el coeficiente de correlación de Pearson r , calculado en cada uno de los cortes ópticos que conforman la rebanada mostrada en la figura 13 y figura 15. En este gráfico se aprecia que ambos grupos presentan una distribución de r similar, con valores mínimos de 0.47 para la rata control (cuadrados azules) y 0.5 para la rata HAP (triángulos rojos) y valores máximos de 0.61 y 0.7 para la rata control y HAP respectivamente.

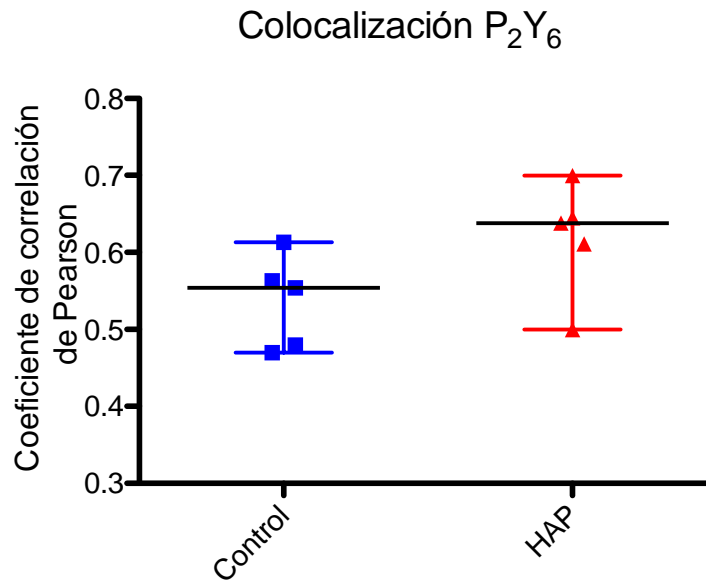


Figura 16. Distribución del coeficiente de correlación de Pearson r en cada corte óptico (5 μ m) obtenido en el Z Stacking confocal, para las rebanadas marcadas con anticuerpo anti P₂Y₆, mostradas en la imagen de superposición de la VIP de una rata control (Fig. 13, cuadrados azules) y en la imagen de superposición de la VIP de una rata HAP (Fig. 15, triángulos rojos). $p=0,09$.

En la figura 17 se observan las imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del receptor P₂Y₁₄ y alfa actina de músculo liso en una VIP de una rata control. En la imagen de contraste de fase (Figura 17-A) es posible identificar la estructura de una vena intrapulmonar pequeña en la que se indica la pared con una flecha roja y el lumen con una flecha blanca.

En la figura 17-B se observa la marca de DAPI que muestra la celularidad en la misma zona en que en la imagen anterior se identifica la pared del vaso, disminuye

en la zona del lumen (flecha blanca). En la figura 17- C se observa la disposición fibrilar del músculo liso, alrededor del lumen del vaso, gracias a la señal fluorescente roja del anticuerpo anti alfa actina de músculo liso. En la figura 17-D se observa la marca de la expresión del receptor P_2Y_{14} (verde) lo que confirma su presencia en venas intrapulmonares pequeñas de rata control, sin embargo al realizar una superposición de las imágenes 17-B y 17-C se observan las señales mayoritariamente independientes del receptor P_2Y_{14} y de la alfa actina de músculo liso (Figura 18).

Al realizar los test de colocación para la figura 18, el valor de r corresponde a 0,41, el índice de Manders $M1= 0,45$ y $M2= 0,47$, lo cual nos permite afirmar por un lado que el receptor P_2Y_{14} se encuentra en músculo liso de venas intrapulmonares pequeñas en ratas controles, sin embargo, la correlación existente es objetivamente menor al ser comparado con el receptor P_2Y_6 en el mismo grupo de animales. Al analizar el porcentaje de intensidad de la fluorescencia del anticuerpo anti P_2Y_{14} en una VIP de rata control se observa que este corresponde a un 38%.

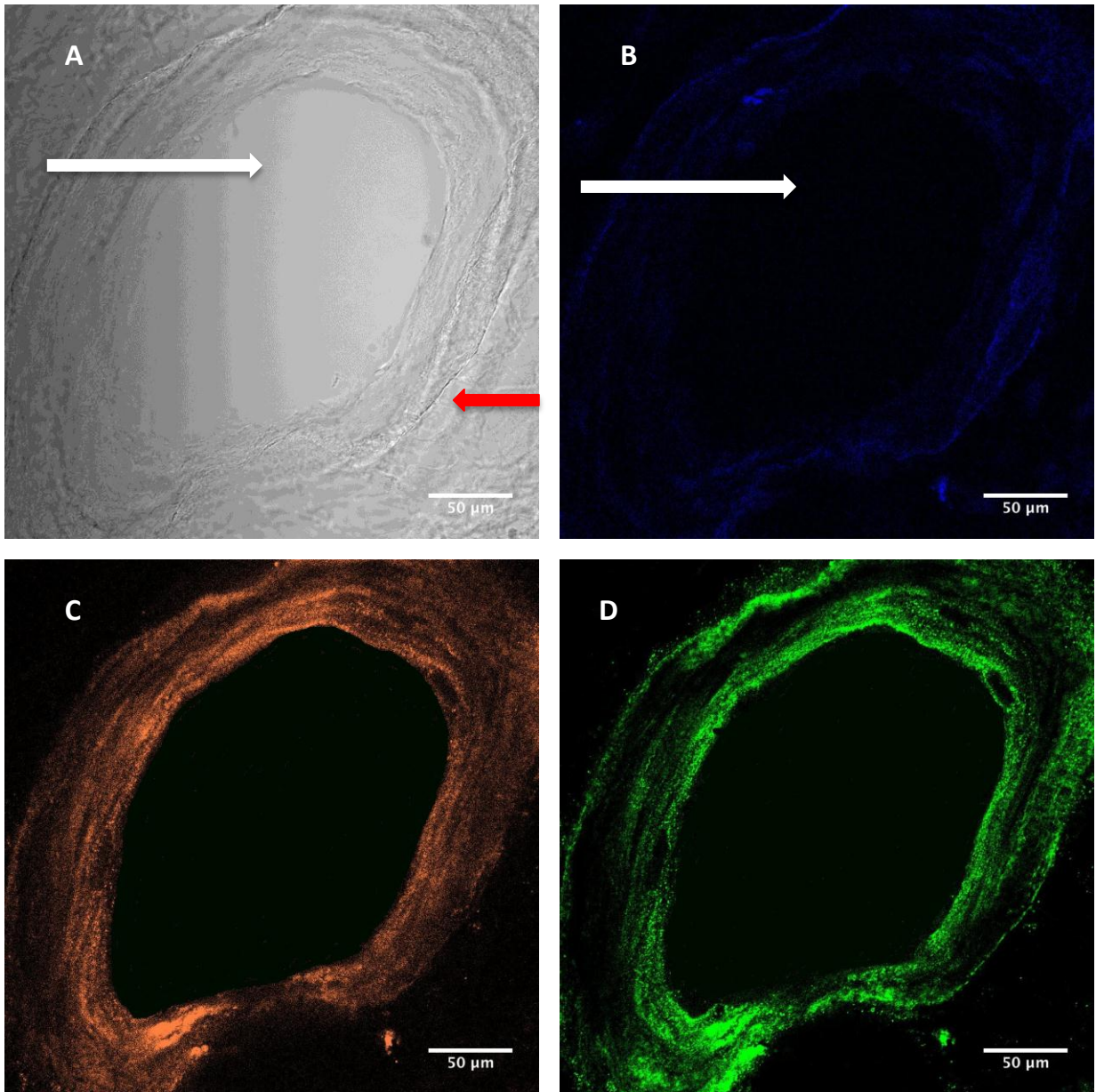


Figura 17. Imagen confocal de una rebanada de pulmón que muestra a P_2Y_{14} en VIP de una rata Control. Corte óptico de 5 μm . (A) Contraste de fase de la rebanada (B) Imagen de la rebanada mostrada en A, con marca DAPI (C) Imagen de la rebanada mostrada en A, marcada con anticuerpo específico para alfa actina del músculo liso, (D) Imagen de la rebanada mostrada en A, marcada con anticuerpo específico para receptor P_2Y_{14} Flechas blancas= lumen del vaso, flecha roja= pared del vaso.

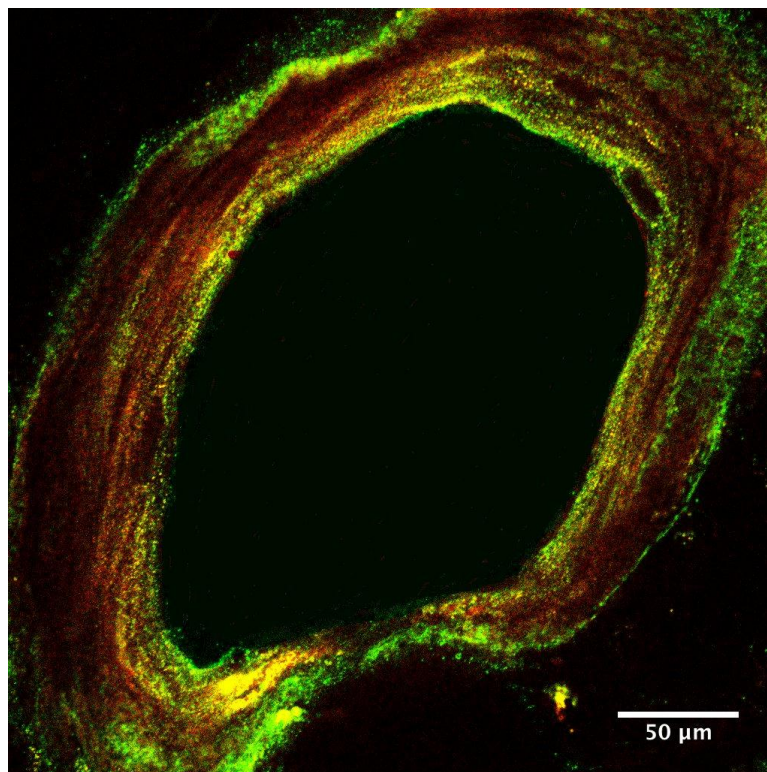


Figura 18. Superposición de la imagen de VIP marcada con anticuerpo específico para receptor P_2Y_{14} y marcada con anticuerpo específico para alfa actina del músculo liso. Corte óptico de 5 μm .

En la figura 19 se muestra la señal de inmunofluorescencia para identificar al receptor P_2Y_{14} y alfa actina de músculo liso en una VIP de rata HAP. En la imagen de contraste de fase (Figura 19-A) es posible observar la estructura del vaso, identificando la pared (flecha roja) y el lumen del mismo (flecha blanca).

En la figura 19-B se muestra la marca generada por el anticuerpo anti alfa actina de músculo liso que coincide con el espesor de la pared del vaso indicado por la flecha roja de la figura 19-A. La señal originada por el anticuerpo anti P_2Y_{14} se observa en la misma zona de la señal dada por alfa actina, lo cual es confirmado al realizar la superposición de ambas imágenes (Figura 20) en el que predomina el color amarillo.

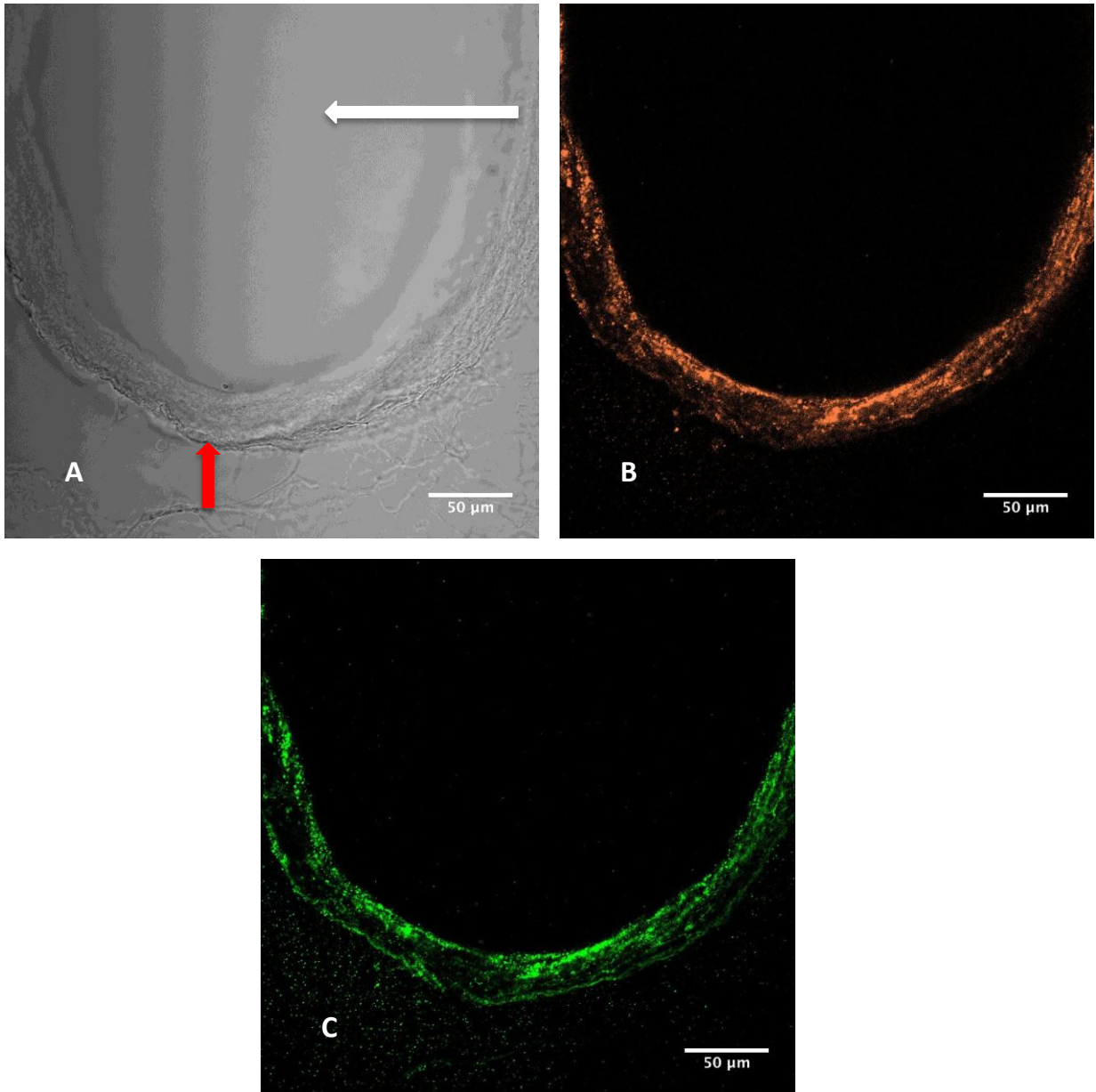


Figura 19. Imagen de una rebanada de pulmón que muestra a P_2Y_{14} en VIP de una rata HAP. Corte óptico de 5 μm . (A) Contraste de fase de la rebanada (B) Imagen de la rebanada mostrada en A, marcada con anticuerpo específico para alfa actina del músculo liso, (C) Imagen de la rebanada mostrada en A, marcada con anticuerpo específico para receptor P_2Y_{14} . Flecha blanca= lumen y flecha roja= pared del vaso.

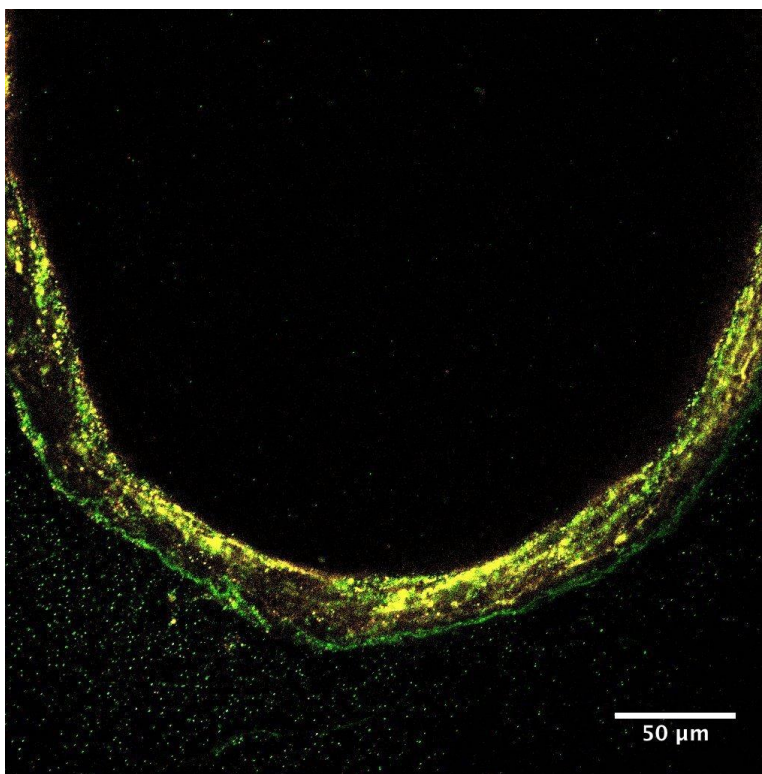


Figura 20. Superposición de la imagen de VIP marcada con anticuerpo específico para receptor P_2Y_{14} y marcada con anticuerpo específico para alfa actina del músculo liso. Corte óptico de 5 μm .

El valor de r de la correlación de Pearson para la figura 20, calculado al realizar el test de colocalización es de 0,62 y el índice de Manders $M_1= 0,68$ y $M_2= 0,77$ lo cual nos indica que efectivamente el receptor P_2Y_{14} se encuentra localizado en músculo liso de VIP en ratas HAP, existiendo una correlación entre receptor y músculo liso objetivamente mayor que en ratas controles. En la VIP de rata HAP, el porcentaje de intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti P_2Y_{14} es de 70%.

En la Figura 21 se muestra la distribución que presentó el coeficiente de correlación de Pearson r para cada uno de los cortes ópticos obtenidos de las rebanadas de

pulmón marcadas con anticuerpo anti receptor P_2Y_{14} . En esta se puede observar, que los r correspondientes a la imagen de la figura 18 (rata control) se aprecian homogéneamente distribuidos cerca de 2 puntos por debajo de los r que representan la correlación en los cortes ópticos de la imagen de la figura 20 (rata HAP).

Lo anterior, nos permite confirmar que en toda la longitud de las venas intrapulmonares pequeñas observadas (y no sólo en un corte óptico aislado) la colocalización alfa actina de músculo liso y receptor P_2Y_{14} se mantiene cercana a 0,4 en el caso de la rebanada perteneciente a una rata control y cercana a 0,6 en la rebanada de rata HAP.

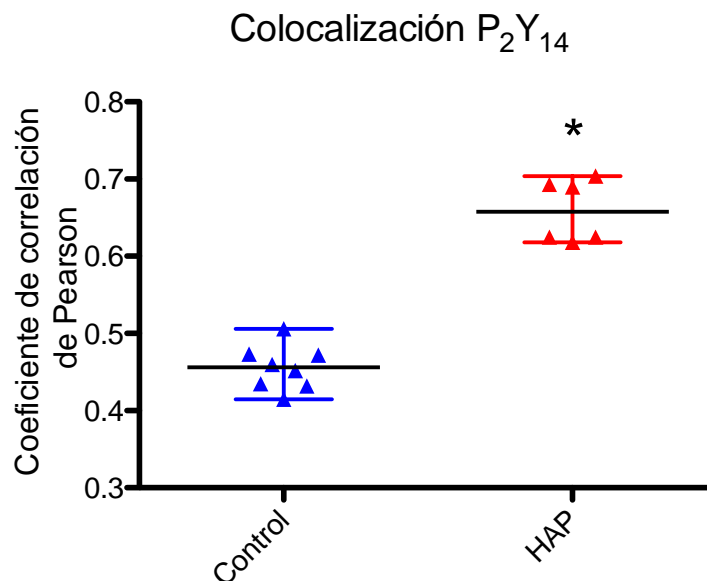


Figura 21. Distribución del coeficiente de correlación de Pearson r en cada corte óptico (5 μ m) obtenido en el Z Stacking confocal, para las rebanadas marcadas con anticuerpo anti P_2Y_{14} , mostradas en la imagen de superposición de la VIP de una rata control (Fig. 18, triángulos negros) y en la imagen de superposición de la VIP de una rata HAP (Fig. 20, triángulos rojos). * Diferencia significativa según Mann – Whitney test, $p = 0,002$.

En la figura 22 se muestra la distribución de los datos obtenidos con el test Colocalization Threshold para cada uno de los cortes ópticos correspondientes a las rebanadas de las imágenes analizadas. En la figura 22-A se observa el índice de Manders M1 que muestra la proporción de señal roja (alfa actina de músculo liso) que colocaliza con la señal verde (receptor P₂Y). En la figura 22- B se observa el índice de Manders M2 que muestra la proporción de señal verde (receptor P₂Y) que colocaliza con la señal roja (alfa actina de músculo liso). En ambos gráficos el índice de Manders muestra una colocalización significativamente menor para el receptor P₂Y₁₄ en el grupo control, con una mediana de 0,48 para el M1 ($p = 0,007$) y 0,55 para el M2 ($p = 0,001$).

En la figura 22-C se graficó el porcentaje de intensidad de la señal fluorescente generada por el anticuerpo anti receptor P₂Y₆ y P₂Y₁₄, encontrándose una intensidad de fluorescencia significativamente menor del receptor P₂Y₁₄ en el grupo control, con una mediana de 48% de intensidad con un $p= 0,002$.

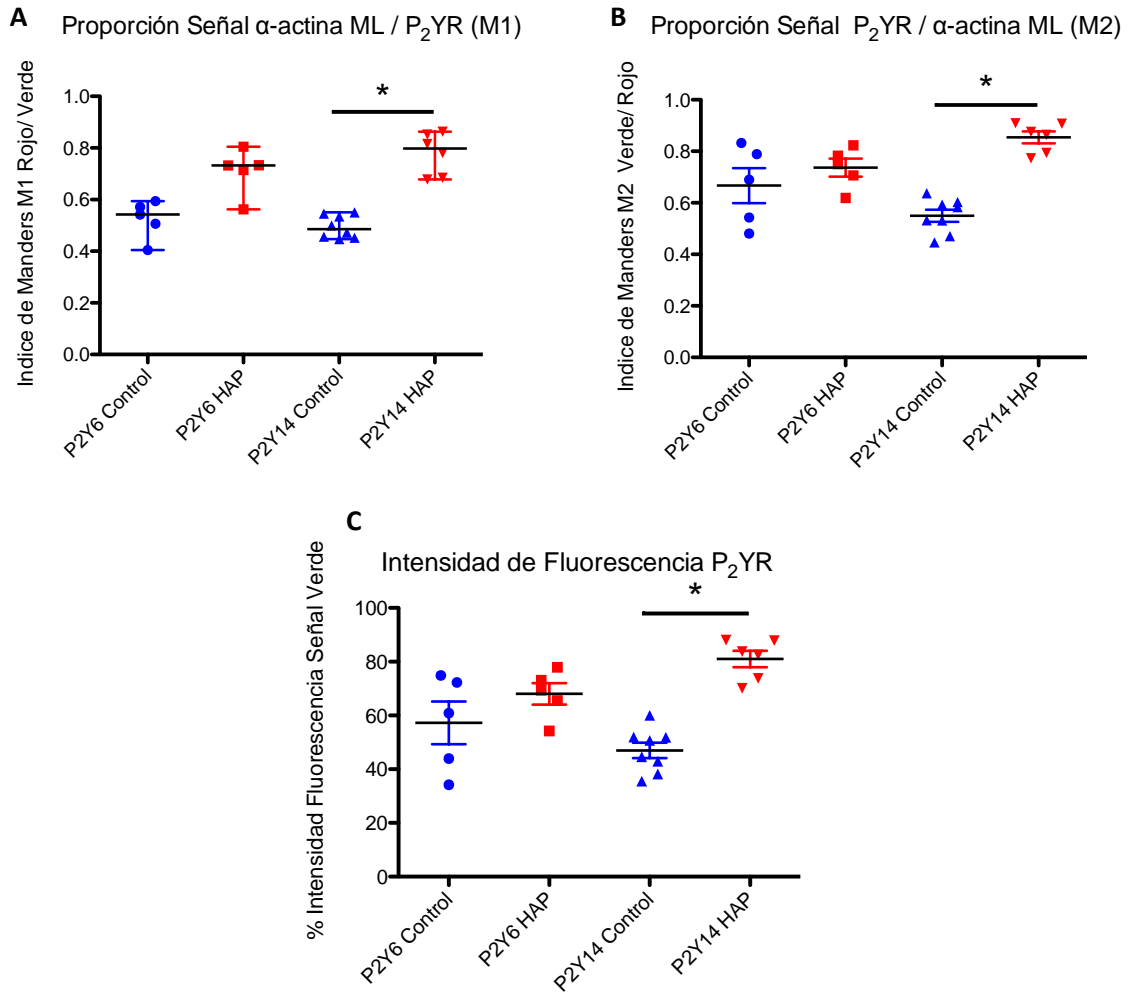


Figura 22.- Distribución de los datos obtenidos desde el test Colocalization Threshold. (A) Índice de Manders M1. (B) Índice de Manders M2. (C) Intensidad de la señal fluorescente del anticuerpo anti receptor P₂Y. * Diferencia significativa según Kruskal – Wallis test, p < 0,05.

7.- Discusión

En la actualidad existe escasa o nula bibliografía respecto del comportamiento de venas intrapulmonares frente a la estimulación con distintos nucleótidos. En este campo, nuestros resultados en ratas muestran que el UDP es un agonista capaz de inducir contracción en las venas intrapulmonares pequeñas (menores a 200 μm) de una forma dosis dependiente. El valor EC_{50} obtenido desde la curva dosis respuesta a UDP de ratas controles, está en concordancia con lo indicado en la literatura (Jacobson et al., 2010; Govindan et al., 2010) encontrándose en el mismo orden de magnitud, con un pEC_{50} de 6,5 siendo el valor de pEC_{50} obtenido por nosotros de 5,61 correspondiente a una concentración de 2,45 μM de UDP.

Respecto de la evidencia publicada en relación con el control purinérgico del tono vascular pulmonar, se han llevado a cabo estudios que trabajan con arterias intrapulmonares de ratas. Estos autores también han mencionado que UDP tiene un efecto de vasocontracción en arterias intrapulmonares pequeñas de ratas sanas, sin embargo, los valores EC_{50} de UDP descritos por ellos son muy superiores a los encontrados en nuestros resultados siendo 300 μM el $\text{EC}_{40\text{K}}$ descrito por Chootip et al., 2002 y 85,5 μM según Mitchell et al., 2012 muy distante de 2,45 μM de UDP que fue el EC_{50} obtenido desde nuestra curva dosis respuesta a UDP en ratas controles. En un intento por explicar estas diferencias es importante señalar al menos dos puntos; primero el tipo de vaso intrapulmonar estudiado es diferente (arterias versus venas) con características estructurales y fisiológicas distintas y en segundo lugar, la técnica utilizada para realizar los experimentos también es diferente, en los estudios mencionados de Chootip et al. y Mitchell et al. el análisis de la vasocontracción lo

hacen con miografía, técnica que utiliza “anillos” de vasos a diferencia de nuestros estudios funcionales realizados con rebanadas de pulmón que implica considerar en la vaso-reactividad un número de variables físicas y biomecánicas que con el vaso desnudo no están siendo incluidas y que son capaces de influir en los resultados finales, como la concentración EC_{50} .

Respecto de la presencia del receptor P_2Y_6 en arterias intrapulmonares de rata Mitchell et al. en el año 2012 describió que dicho receptor estaba presente, lo cual fue probado de manera funcional tras haber estimulado con PSB0474 agonista específico para el mismo, indicando que el EC_{40K} de este agonista se encontró en $27,3 \mu M$ y también por biología molecular con RT-PCR para el mismo receptor. Si bien nosotros no realizamos una curva dosis respuesta para el agonista específico del receptor P_2Y_6 efectivamente encontramos que al estimular con $500 \mu M$ de PSB0474 existe contracción de VIP y que esta contracción es mayor a la lograda por $500 \mu M$ de UDP, lo cual coincide con lo publicado por Mitchell et al. Este mismo grupo de investigadores en su publicación del año 2012, mencionaron que la inhibición de la contracción inducida por UDP al utilizar el antagonista específico para el receptor P_2Y_6 (MRS2578) era de un 25%, valor bastante cercano al 34% de inhibición logrado en nuestros experimentos con ratas controles al incubar con MRS2578 $100 nM$.

Al investigar en la bibliografía respecto de la presencia del receptor P_2Y_{14} , los resultados disponibles en la literatura son divergentes dependiendo del tejido al cual pertenece la arteria estudiada. Hanees et al., en el año 2014 mencionaron que UDP - Glucosa es capaz de inducir una contracción máxima de 60% normalizada por K^+ ,

con un EC_{50} de 100 μ M en arteria coronaria y de 97 nM en arteria basilar de ratón. Otros autores que demostraron vasoconstricción arterial con UDP – Glucosa fue Alsaqati et al., en el año 2013 en arteria pancreática de porcino, quien indica que la contracción lograda por UDP – Glucosa y UDP es equipotente. Sin embargo, los autores que han publicado estudios en arterias intrapulmonares no han logrado obtener vasoconstricción con UDP- Glucosa 100 μ M en animales sanos. Si bien nuestros resultados en VIP difieren de lo publicado en arterias intrapulmonares, en relación a que en nuestro grupo de ratas controles la UDP– Glucosa si indujo vasoconstricción con 500 μ M, la contracción lograda en nuestra investigación (5,7%; Min. 0,2% – Max. 39,2%) permanece muy distante de la obtenida en vasos de otro sistema como el pancreático o cerebral.

No existe hasta el momento bibliografía disponible de recepción purinérgica en venas intrapulmonares en un modelo de hipertensión arterial pulmonar, por lo cual, sólo contamos con nuestros resultados para discutir el rol de dichos receptores en esta patología.

Inicialmente, al analizar el modelo de HAP-MCT, observamos que nuestros resultados muestran una elevación significativa en el índice de Fulton del grupo HAP, lo que nos permite confirmar que el grupo de ratas experimentales desarrollan efectivamente la enfermedad, condición base para la realización de la investigación. Esta afirmación es factible debido a que la literatura disponible ha demostrado una alta correlación entre el índice de Fulton y la medición de parámetros hemodinámicos (PAPm) y eco-cardiográficos (Tiempo de aceleración pulmonar, PAAT) tanto en modelos murinos de HAP, como también en humanos (Arellano O, 2016; Mam et al.,

2010). El incremento en el índice de Fulton que observamos en nuestros animales se debe a una hipertrofia delimitada al VD, sin aumento en el tamaño del ventrículo izquierdo, lo cual está en concordancia con lo publicado por Ryan et al. en el año 2011 acerca del modelo de HAP inducido por Monocrotalina y que adicionalmente permite corroborar que la MCT induce un aumento específico en la resistencia vascular pulmonar, sin cambios en la vasculatura sistémica y la consecuente resistencia vascular sistémica (Ryan et al., 2011). Es sabido que una dosis de 60 mg/Kg tiene especificidad por el sistema pulmonar, generando alteraciones a nivel de la vasculatura pulmonar que desencadenan una remodelación obstructiva y el desarrollo de HAP, sin embargo, uno de los cambios que encontramos a nivel de los pulmones de las ratas del grupo HAP fue el aumento significativo en la relación peso pulmonar gr./peso corporal gr. en comparación con el grupo control (0,048 versus 0,052 respectivamente). Analizar el peso pulmonar relacionándolo con el peso corporal es fundamental, debido que se sabe que las ratas inyectadas con MCT presentan una menor tasa de crecimiento al ser comparadas con ratas sanas, lo cual se debe a una menor ingesta de alimento y de agua (Gillis et al., 1978). Es esperable por lo tanto que un animal cuyo aumento de peso corporal es menor mantenga también un menor aumento en el peso de sus órganos en particular, relación que no ocurre en nuestras ratas HAP, quienes presentan un aumento en el peso pulmonar relativo a su peso corporal. Este aumento relativo en el peso de los pulmones de las ratas HAP puede deberse al desarrollo de edema pulmonar en estos animales, lo cual ya ha sido reportado en la literatura (Gómez – Arroyo et al., 2011) y que podría confirmarse evaluando la diferencia entre el peso húmedo y peso seco de las muestras pulmonares de ratas HAP en comparación con las del grupo control.

Finalmente al analizar la respuesta funcional de las VIP en el modelo HAP, lo que encontramos es que efectivamente, tal como describimos en nuestra hipótesis, en ratas con HAP el UDP logra una hipercontracción en comparación con ratas controles y esta hipercontracción sería principalmente debido a la contracción significativamente mayor inducida vía P_2Y_{14} en ratas HAP y en menor medida al receptor P_2Y_6 el cual presenta una tendencia a la hipercontracción en venas de ratas HAP, pero que sin embargo aún no es diferente de la lograda en el grupo control.

Basándonos en estudios como los publicados por Visovatti et al., 2016 y Helenius et al., 2015 quienes proponen que en HAP habría un aumento en la concentración intravascular de nucleótidos (específicamente demostrado para ATP) y al asociar este conocimiento con datos recientes que proponen al ATP como un mediador con un rol clave en cambios transcripcionales observados en músculo esquelético (Casas et al., 2014) es plausible pensar que ratas con HAP presentan elevadas concentraciones intravasculares de nucleótidos (por disminución en la expresión y actividad de ectonucleotidasas) lo cual logra inducir cambios en la expresión génica a nivel de las fibras musculares lisas de los vasos intrapulmonares y esto puede generar tanto un aumento en la expresión del receptor P_2Y_{14} a nivel del músculo liso de VIP, como también una mayor activación de la maquinaria contráctil del mismo, siendo ambas posibilidades no excluyentes. Lo que sabemos hasta el momento en relación a esta hipótesis, de acuerdo a datos aun no publicados de nuestro laboratorio, es que no existe diferencia en el grosor de la capa muscular de VIP entre el grupo de ratas HAP y el grupo control, por lo cual es poco probable que sea un

engrosamiento de la pared venosa el responsable de la hipercontractilidad venosa observada.

Considerando este rol destacado del receptor P_2Y_{14} en la respuesta hipercontráctil observada en el grupo de ratas HAP frente a UDP, se hace necesario buscar opciones de tratamiento para ensayos futuros en los cuales se pueda determinar si la inhibición específica del receptor P_2Y_{14} genera cambios ya sea histológicos, fisiológicos o clínicos en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la literatura disponible ha demostrado su presencia y participación en funciones de múltiples sistemas, incluso se ha demostrado su rol en procesos de vasoconstricción arterial en el sistema coronario y cerebral de ratones (Haanes et al., 2014) motivo por el cual si buscamos inhibir su función a modo de tratamiento para la HAP, es necesario que esta inhibición sea específica en el sistema vascular pulmonar. Una de las formas más sencillas para lograr especificidad por el sistema pulmonar y altas concentraciones en el mismo es través de terapia inhalada, por lo cual proponemos esta como una posible vía de acción terapéutica en la cual se administre el antagonista específico del receptor P_2Y_{14} al sujeto en estudio. Otra posible vía de tratamiento se puede lograr a través de terapia génica, con la cual podemos modificar la expresión del gen que codifica para este receptor específicamente en el tejido de nuestro interés. Es necesario en ambos casos el desarrollo de estudios en modelos animales ya sea a través de terapia inhalatoria con antagonista específico del receptor P_2Y_{14} o con un modelo Knock-out P_2Y_{14} tejido específico, lo cual nos permitirá posteriormente avanzar hacia la realización de ensayos clínicos en este campo.

Finalmente nuestros resultados nos permite concluir que es el receptor P_2Y_{14} el que presenta una destacada participación en la pato-fisiología de la HAP; esto debido a que su activación específica induce una respuesta hipercontráctil de las VIP en ratas enfermas, lo que se ve respaldado por su mayor colocalización e intensidad de fluorescencia a nivel del músculo liso en la pared de VIP de ratas HAP. Esto nos permite pensar en el receptor P_2Y_{14} como un nuevo blanco de acción farmacológica para el tratamiento de una enfermedad que en la actualidad sigue terminando precozmente con la vida de personas en edad activa.

8.- Productividad Científica

Los resultados de esta tesis han sido y serán presentados en destacados congresos y reuniones científicas que son detalladas a continuación.

- II Meeting on research and innovation in vascular health, 2017.
- II Feria de grados académicos del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), 2017.
- Congreso internacional de purinas, 2018.
- XXIII Reunión anual de Sociedad chilena de ciencias fisiológicas, 2018.

9.- Bibliografía

- 1.- Arellano O. “Papel de los receptores P2Y2 y/o P2Y4 en venas intrapulmonares pequeñas en un modelo de hipertensión arterial pulmonar (Tesis de Magister)”. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Chile, 2016.
- 2.- Alsaqati, M.; Latif, M.; Chan, S.; Ralevic, V. “Novel vasocontractile role of P2Y14 receptor: characterization of its signalling in porcine isolated pancreatic arteries”. *Brit J Pharmacol.* 171: 701 – 713, 2014.
- 3.- Ataya, A.; Cope, J.; Alnuaimat, H. “A review of targeted pulmonary arterial hypertension- specific pharmacotherapy”. *J Clin Med.* 5: 114, 2016.
- 4.- Burnstock, G. “Control of vascular tone by purines and pyrimidines”. *Brit J Pharmacol.* 161: 527 – 529, 2010.
- 5.- Burnstock, G.; Ralevic, V. “Purinergic signaling and blood vessels in health and disease”. *Pharmacol Rev.* 66: 102 – 292, 2014.
- 6.- Casas, M.; Buvinic, S.; Jaimovich, E. “ATP signaling in skeletal muscle: From fiber plasticity to regulation of metabolism”. *Excer Sport Sci Rev.* 42 (3): 110 – 116, 2014.
- 7.- Chootip, K.; Ness, K.; Wang, Y.; Gurney, A.; Kennedy, C. “Regional variation in P2 receptor expression in the rat pulmonary arterial circulation”. *Brit J Pharmacol.* 137: 637 – 646, 2002.

- 8.- Chootip, K.; Gurney, A.; Kennedy, C. "Multiple P2Y receptors couple to calcium - dependent, chloride channels in smooth muscle cells of the rat pulmonary artery". *Respir Res.* 6: 124 – 133, 2005.
- 9.- Costes, S.; Daelemans, D.; Cho, E.; Dobbin, Z.; Pavlakis, G.; Lockett, S. "Automatic and quantitative measurement of protein – protein colocalization in live cells". *Biophys J.* 86: 3993 – 4003, 2004.
- 10.- Counter, W.; Wang, I.; Farncombe, T.; Labiris, N. "Airway and pulmonary vascular measurements using contrast- enhanced micro – CT en rodents". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 304: 831– 843, 2013.
- 11.- Dumitrascu, R.; Koebrich, S.; Dony, E.; Weissman, N.; Savai, R.; Pullamsetti, S.; Ghofrani, H.; Samidurai, A.; Traupe, H.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Schermuly, R. "Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole – induced acute lung injury". *BMC Pulm Med,* 8: 25 – 40, 2008.
- 12.- Galiè, N.; Humbert, M.; Vachieri, J.; Gibbs, S.; Lang, I.; Torbicki, A.; Simonneau, G.; Peacock, A.; Vonk Noordegraaf, A.; Beghetti, M.; Ghofrani, A.; Gomez, M.; Hansmann, G.; Klepetko, W.; Lancellotti, P.; Matucci, M.; McDonagh, T.; Pierard, L.; Trindade, P.; Zompatori, M.; Hoeper, M. "2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension". *Eur Respir J.* 46: 903 – 975, 2015.
- 13.- Gillis, C.N.; Ryan, J.; Roth, H.; Roth, R. "Effects of monocrotaline pretreatment of rats on removal of 5- hydroxytryptamine and noradrenaline by perfused lung". *Br. J. Pharmac.* 63: 435 – 443, 1978.

- 14.- Gómez- Arroyo, J.; Farkas, L.; Alhussaini, A.; Farkas, D.; Kraskauskas, D.; Voelkel, N.; Bogaard, H. "The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 302: 363 – 369, 2011.
- 15.- Govindan, S.; Taylor, E. JA.; Taylor C. W. "Ca²⁺ signalling by P2Y receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells". *Brit J Pharmacol*. 160: 1953 – 1962, 2010.
- 16.- Haanes, K.; Edvinsoon, L. "Characterization of the contractile P2Y₁₄ receptor in mouse coronary and cerebral arteries". *FEBS Lett*. 588: 2936 – 2943, 2014.
- 17.- Hambly, N.; Alawfi, F.; Mehta, S. "Pulmonary Hypertension: Diagnostic approach and optimal management". *CMAJ*. 188 (11): 804 – 812, 2016.
- 18.- Helenius, M.; Vattulainen, S.; Orcholski, M.; Aho, J.; Komulainen, A.; Taimen, P.; Wang, L.; Perez, V.; Koskenvuo, J.; Alastalo, T. "Suppression of endothelial CD39/ENTPD1 is associated with pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 208: 1046 – 1057, 2015.
- 19.- Henríquez, M.; Fonseca, M.; Perez – Zoghbi, JF. "Purinergic receptor stimulation induces calcium oscillations and smooth muscle contraction in small pulmonary veins" *J Physiol*. 2018. DOI 10.1113/JP274731.

- 20.- Hiorns, J.; Bidan, C.; Jensen, O.; Gosens, R.; Kistemaker, L.; Fredberg, J.; Butler, J.; Krishnan, R.; Brook, B. "Airway and parenchymal strains during bronchoconstriction in the precision cut lung slice". *Front Physiol.* 7 (309), 2016.
- 21.- Hislop, A.; Reid, L. "Fetal and Childhood development of the intrapulmonary veins in man-branching pattern and structure". *Thorax.* 28: 313 – 319, 1973.
- 22.- Humbert, M.; Ghofrani, H. "The molecular targets of approved treatments for pulmonary arterial hypertension". *Thorax.* 71: 73 – 83, 2016.
- 23.- Jacobson, K. "P2X and P2Y receptors". *Tocris Bioscience Scientific Review Series.* 1 – 16, 2010.
- 24.- Kylhammar, D.; Bune, L.T.; Radegran, G. " P2Y1 and P2Y12 receptors in hypoxia – and adenosine diphosphate – induced pulmonary vasoconstriction in vivo in pig". *Eur J Appl Physiol.* 114 (9): 1995 – 2006, 2014.
- 25.- Lazarowski, E.; Boucher, R.; Harden, K. "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X and P2Y receptor activating molecules". *Mol Pharmacol.* 64: 785 – 795, 2003.
- 26.- Maarman, G.; Lecour, S.; Butrous, G.; Thienemann, F.; Sliwa, K. "A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet?". *Pulm Circ.* 3 (4): 739 – 756, 2013.
- 27.- Manders, E.; Verbeek, F.; Aten, J. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* 169: 375 – 382, 1993.

- 28.- Mitchell, C.; Syed, N.; Tengah, A.; Gurney, A.; Kennedy, C. "Identification of contractile P2Y1, P2Y6, and P2Y12 receptors in rat intrapulmonary artery using selective ligands". *JPET*. 343: 755 – 762, 2012.
- 29.- Mitchell, C.; Syed, N.; Gurney, A.; Kennedy, C. "A Ca²⁺-dependent chloride current pulmonary vasoconstriction". *Brit J Pharmacol*. 166: 1503 – 1512, 2012.
- 30.- Rajkumar, R.; Konishi, K.; Richards, T.; Ishizawar, D.; Wiechert, A.; Kaminski, N.; Ahmad, F. "Genomewide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 298: 1235 – 1248, 2010.
- 31.- Ralevic, V.; Burnstock, G. "Receptors for purines and pyrimidines". *Pharmacol Rev*. 50 (3): 413 – 492, 1998.
- 32.- Ralevic, V.; Dunn, W. "Purinergic transmission in blood vessels". *Auton Neurosci*. 191: 48 – 66, 2015.
- 33.- Ryan, J.; Bloch, K.; Archer, L. "Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with health organisation's categorisation of human PH". *Int J Clin Pract*. 65: 15 – 34, 2011.

- 34.- Rosner, S.; Ram- Mohan, S.; Paez- Cortez, J.; Lavoie, T.; Dowell, M.; Yuan, L.; Ai, X.; Fine, A.; Aird, W.; Solway, J.; Fredberg, J.; Krishnan, R. "Airway contractility in the precision- cut lung slice after cryopreservation". *Am J Respir Cell Mol Biol.* 50 (5): 876 – 881, 2014.
- 35.- Sacristán, C. "Participación de los receptores purinérgicos P2Y en la contracción inducida por ADP de venas intrapulmonares pequeñas: Posible rol en la hipertensión arterial pulmonar en modelo animal" (Tesis de Pregrado). Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Chile 2014.
- 36.- Sanderson, M. "Exploring lung physiology in health and disease with lung slices". *Pulm Pharmacol Ther.* 24 (5): 452 – 465, 2011.
- 37.- Shimoda, L. Laurie, S. "Vascular remodeling in pulmonary hypertension". *J Mol Med (Berl).* 91 (3): 297 – 309, 2013.
- 38.- Tsai, H.; Sung, Y.; Perez, V. "Recent advances in the management of pulmonary arterial hypertension". *F1000Research.* 5: 2755, 2016.
- 39.- Visovatti, S.; Hyman, M.; Goonewardena, S.; Anyanwu, A.; Kanthi, Y.; Robichaud, P.; Wang, J.; Petrovic- Djergovic, D.; Rattan, R.; Burant, C.; Pinsky, D. "Purinergic dysregulation in pulmonary hypertension". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 311: 286 – 298, 2016.

- 40.- Zagolín, M.; Uriarte, P.; Arancibia, F.; Castro, P.; Sepúlveda, P.; Sepúlveda, L.; Llancaqueo, M.; Sepúlveda, R.; Aguirre, D.; Cruz, M. “Orientaciones 2016: Manejo clínico de la hipertensión arterial pulmonar Grupo I”. *Ministerio de Salud, Gobierno de Chile*; 2016.